Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK
R. HARDER-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

W. RUHLAND UNTERDEUFSTETTEN — **L. BRAUNER** MÜNCHEN — **E. BÜNNING** TÜBINGEN

51. BAND, 5. HEFT

MIT 24 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 11. JUNI 1958)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958

Planta (Berl.)

Preis DM 22.80

Planta, Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*.

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 130131

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

---

51. Band **Inhaltsverzeichnis** 5. Heft

Seite

Wolf, J., Beitrag zur Kenntnis der organischen Säuren der Süßkirsche und ihrer Veränderungen im Verlauf der Fruchtentwicklung 547

Czeika, G., Über das spontane Auftreten von Mitosen und inäqualen Cytokinesen in der endopolyploiden Epidermis von Portulaca grandiflora. Mit 6 Textabbildungen 566

Rackow, B., Ist die pflanzliche Photosynthese eine Lichtreaktion mit rückläufiger Dunkelreaktion? Ein Versuch, manometrische Licht-Dunkel-Kurven von Chlorella zu erklären. Mit 2 Textabbildungen 575

Geitler, L., Selektive Paarung und gegenseitige Beeinflussung der Kopulationspartner bei der Diatomee Cocconeis. Mit 5 Textabbildungen 584

Michaelis, P., Untersuchungen zur Mutation plasmatischer Erbträger, besonders der Plastiden. I. Teil. Mit 2 Textabbildungen 600

Kating, H., Über die Beziehungen zwischen γ-Aminobuttersäure und Glutaminsäure bei Chlorella vulgaris var. viridis 635

Huber, B., und W. Merz, Über die Bedeutung des Hoftüpfelverschlusses für die axiale Wasserleitfähigkeit von Nadelhölzern. I. Mitteilung. Grunderscheinungen. Mit 6 Textabbildungen 645

Huber, B., und W. Merz, Über die Bedeutung des Hoftüpfelverschlusses für die axiale Wasserleitfähigkeit von Nadelhölzern. II. Mitteilung. Vergleichende Untersuchungen und praktische Anwendungen. Mit 3 Textabbildungen 660

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta, Bd. 51, S. 547—565 (1958)

Mitteilung aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung Karlsruhe

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER ORGANISCHEN SÄUREN DER SÜSSKIRSCHE UND IHRER VERÄNDERUNGEN IM VERLAUF DER FRUCHTENTWICKLUNG*

Von

JOHANNES WOLF

(Eingegangen am 18. Januar 1958)

Einleitung

Nach den übereinstimmenden Angaben der Literatur ist Äpfelsäure die bei weitem vorherrschende Säure der reifen Kirsche (BIGELOW und DUNBAR 1917, FRANZEN und HELWERT 1922, NELSON und CURL 1939, BRIDGES 1941, GUICHARD 1955). Andere Säuren, wie Citronensäure, Oxalsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Weinsäure und ungesättigte Säuren kommen höchstens in Spuren vor, ebenso auch flüchtige Säuren, wie Essig-, Ameisen- und Salicylsäure (vgl. MARSHALL 1954, S. 123). HERRMANN (1956) fand Chlorogensäure, Kaffeesäure dagegen nicht oder höchstens in Spuren. GUICHARD (1955) gibt an, daß außer Äpfelsäure lediglich eine Gruppe nicht identifizierter Säuren in bemerkenswerten Mengen vorhanden sei, die mit einer in Erdbeeren angetroffenen und als Zuckerphosphate angesprochenen Fraktion möglicherweise identisch ist. Citronensäure wurde wohl in den Blättern der Kirsche nachgewiesen, nicht aber in den Früchten angetroffen (GUICHARD 1955).

Im Verlauf der Fruchtentwicklung zeichnen sich folgende Veränderungen ab:

Der p_H-Wert des Fruchtfleisches liegt bei sehr jungen Früchten bei etwa 4,5; im Verlauf des Wachstums sinkt der Wert ab und erreicht ein Minimum (von etwa p_H 3—3,5) gewöhnlich dann, wenn sich die Frucht zu röten beginnt oder ihre volle Färbung erreicht hat, worauf die Werte allmählich ansteigen (CALDWELL 1934, BOHART 1936, KEITT u. a. 1937, GUICHARD 1955).

Die titrimetrische Acidität des Fruchtfleisches vergrößert sich in der Regel so lange, bis die Frucht ihre volle Färbung erreicht hat, und vermindert sich allmählich, wenn die Frucht überreif wird (CALDWELL 1934, GUICHARD 1955); in anderen Fällen indes verminderte sich die titrimetrische Acidität bereits im Verlaufe der Farbentwicklung (HARTMAN und BULLIS 1929, BOHART 1936, KEITT u. a. 1937). Die titrimetrische Acidität ist lediglich ein Maß für die Menge an freier

* Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. RUHLAND, zu seinem 80. Geburtstag gewidmet.

Säure und an sauren Salzen; über die vorliegende Menge an Gesamtsäure (d. h. also einschließlich der neutralen Salze) sagt sie nichts aus. Beurteilt nach den in reinen wäßrigen Lösungen, z. B. von Äpfelsäure anzutreffenden Verhältnissen ist der Anteil der Neutralsalze an der Gesamtsäure allerdings bereits bei einem p_H-Wert von 4 relativ gering (ca. 6%), und er sinkt mit fallendem p_H-Wert bald auf 0% ab (vgl. hierzu WOLF 1955). Das variable Verhalten der einzelnen Sorten hinsichtlich des Entwicklungszustandes, in dem die titrimetrische Acidität ihren maximalen Wert erreicht, könnte sowohl faktische Konzentrationsänderungen der Gesamtsäure widerspiegeln als auch ein unterschiedliches Ausmaß in Zu- oder Ableitung von Kationen ausdrücken.

Hinsichtlich des Verhaltens der einzelnen Säuren im Verlauf der Reifung sind wir auf die durch quantitative Papierchromatographie gewonnenen Angaben von GUICHARD (1955) angewiesen.

Tabelle 1. *Veränderungen der Gehalte von Kirschen an organischen Säuren im Verlauf der Fruchtreifung* (GUICHARD 1955)

Sorte	Entwicklungszustand	Fruchtgewicht g	p_H	Säurefraktion X	Titrimetrische Acidität je Frucht	Äpfelsäure je Frucht	Titrimetrische Acidität je 100 g Fruchtgewicht	Äpfelsäure je 100 g Fruchtgewicht
Belle d'Orléans	grün	1,33	4,6	+	0,044	0,020	3,31	1,50
	Reifgsbeg.	2	4,3	+	0,070	0,033	3,50	1,65
	reif	3,50	3,6	+	0,210	0,165	6	4,71
Impératrice Eugénie	grün	1,75	4,8	+	0,056	0,030	3,20	1,71
	Reifgsbeg.	4	3,6	+	0,225	0,198	5,62	4,95
	reif	7	3,7	+	0,650	0,630	9,28	9,00 *

* Der im Original angegebene Wert 0,90 ist offensichtlich falsch.

Aus den Angaben von GUICHARD (1955) geht hervor, daß sich Äpfelsäure während der gesamten Dauer der Reifung anhäuft, bezogen sowohl auf die einzelne Frucht als auch auf die Einheit des Fruchtgewichtes. Die nicht identifizierte Säurefraktion X, die in der noch grünen Frucht einen bemerkenswert großen Anteil der Gesamtsäure bestreitet, vermehrt sich in der reifenden Frucht nur wenig, und da der Gehalt an Äpfelsäure in der Reifungsphase stark zunimmt, vermindert sich der prozentuale Anteil von Fraktion X an der Gesamtsäure beträchtlich.

Die Säureverhältnisse der Kirsche erscheinen nach den bisher vorliegenden Beobachtungen offenbar noch keineswegs geklärt. Wir versuchten deshalb, mit Hilfe moderner chromatographischer Methoden einen etwas genaueren Einblick in die Mannigfaltigkeit der Säurezusammensetzung der Süßkirsche zu erlangen und die Säureveränderungen im Verlauf der Fruchtreifung zu verfolgen. Es handelt sich dabei um ein Teilstück eines Versuchsplanes, der darauf ausgerichtet ist,

die bei der Fruchtentwicklung, insbesondere im Verlauf der Reifung sich abspielenden Vorgänge zu erhellen und damit eine objektive physiologische Charakteristik der Früchte zu ermöglichen. Die Kenntnis einer solchen Charakteristik erscheint uns wertvoll im Hinblick auf die Qualität der Früchte zur Zeit der Ernte, und sie können für die Lagerhaltung bedeutsam werden im Sinne einer Voraussage, falls sich Beziehungen aufdecken ließen zwischen dieser Charakteristik und der Haltbarkeit.

Versuchsteil

Material. Die verwendeten Früchte wurden von einem vieljährigen Baum (Hochstamm) eines Privatgartens[1] in neun verschiedenen Entwicklungsstadien jeweils zwischen 8 und 9 Uhr morgens geerntet; die Sorte wurde uns von fachkundiger Seite als „Napoleon" oder dieser nahe verwandt bezeichnet. Einige Angaben zur Charakteristik des Entwicklungszustandes der Früchte der einzelnen Proben sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Methodik. Die Früchte wurden mit 70%igem Alkohol extrahiert; der Extrakt wurde mit Kationen- und Anionenaustauscherharz behandelt und titrimetrisch bestimmt. Die Fraktionen wurden papierchromatographisch geprüft.

1. Extraktion und Vorreinigung der Extrakte

Die Früchte wurden innerhalb von 1—2 Std nach der Ernte gewogen und kreuzweise zerschnitten; die erhärteten Kerne wurden aufgeklopft. Die gesamte Fruchtmasse der Probe wurde anschließend in so viel kochenden 96%igen neutralen, vergällten (mit Petroläther) Alkohol eingebracht, daß die Endkonzentration an Alkohol etwa 70 Vol.-% betrug, wobei für alle Proben ein Wassergehalt der Gesamtfrucht von 80% angenommen wurde. Das Gemisch wurde am Rückflußkühler (Wasserbad) 15 min am Kochen gehalten, dann abgekühlt, quantitativ in den 250 ml-Becher einer Kugelmühle (System Bloch-Rosetti) übergeführt und in Gegenwart von Quarz (gekörnt) etwa 2 Std feinst gemahlen. Die Mahlkugeln wurden dann entfernt. Wir versetzten die Suspension mit einer überschüssigen Menge an Kationenaustauscher (Lewatit KSB, H-Form, 0,3—0,5 mm Korngröße) und schwenkten den Becher weitere 2 Std auf der Exzenterscheibe der Kugelmühle. Dieses Vorgehen bezweckt, die vorliegenden Säuren in Freiheit zu setzen[2]. Die Suspension

[1] Frau Schuster, Lehrerin in Karlsruhe-Durlach, danke ich bestens für die Erlaubnis, das benötigte Versuchsmaterial unbeschränkt zu entnehmen.

[2] Sehr schwer lösliche Salze, wie z. B. Calciumoxalat, werden unter diesen Bedingungen nur bis zu einem bestimmten Ausmaß zerlegt; um eine vollständige Zerlegung zu erreichen, muß die Kationenaustauscherbehandlung mit einer gleichzeitigen Anionenaustauscherbehandlung kombiniert werden.

Tabelle 2. *Angaben zur Charakteristik des Entwicklungszustandes der Früchte der einzelnen Proben*

Bezeichnung der Probe	Datum der Ernte (1956)	Färbung	Mittleres Fruchtgewicht (g)	Fruchtdurchmesser (äquat.) in mm	Fruchtfleisch in % des Fruchtgewichts	Samenschale	Embryo	Größe der Probe (Fruchtzahl)
A	18. 5.	grün	0,0898	3,5— 5,5	—	weich, schneidbar	mit bloßem Auge nicht erkennbar	236
B	18. 5.	grün	0,725	8,5—10,5	—	weich, schneidbar	mit bloßem Auge nicht erkennbar	60
C	18. 5.	grün	0,923	10,5—12	—	beginnt bei einzelnen Früchten zu erhärten	mit bloßem Auge nicht erkennbar	65
D	26. 5.	hellgrün	1,045	11—12	—	beginnt zu erhärten	etwa 2 mm lang (d. h. $^1/_4$ der Höhe der Samenanlage)	60
E	2. 6.	hellgrün	1,215	12,2—12,4	—	ziemlich hart, eben noch zerschneidbar	etwa 7 mm lang (d. h. $^7/_9$ der Höhe der Samenanlage	50
F	9. 6.	hellgrün gelbgrün	1,595	13,3—14,2	—	nicht mehr schneidbar	etwa 10 mm lang (d. h. erfüllt praktisch die gesamte Samenanlage	47
G	16. 6.	grüngelb errötend	2,88	—	—	hart	—	25
I	16. 6.	(dunkel-) rot	4,35	—	—	hart	—	12
K	26. 6.	schwarzrot	5,77	—	90,52	hart	—	9

wurde nunmehr über ein Kieselgurfilter abgenutscht und mit 70 Vol.-%igem vergälltem Alkohol unter sorgfältigem Aufrühren des Filterrückstandes nachgewaschen, bis das Filtrat neutral ablief.

Ein aliquoter Anteil des in allen Fällen völlig klaren Filtrates („1. Kationeneffluat") wurde 2 min lang mäßig gekocht, unter Schutz vor

CO_2-Zutritt abgekühlt und mit 0,1 n NaOH titriert (Phenolphthalein als Indicator).

Der Rest des Filtrates wurde durch eine zuvor mit neutralem vergälltem 70 Vol.-%igem Alkohol gewaschene Anionenaustauschersäule geschickt (11 g [lufttrocken gewogen] Lewatit MI, CO_3-Form, 0,2—0,4 mm Korngröße) und die Säule mit 70%igem Alkohol nachgewaschen (Effluat + Waschflüssigkeit: „Anioneneffluat"). Das Anioneneffluat wurde zum Vertreiben von gelöstem Kohlendioxyd 15 min lang auf dem Wasserbad im leichten Sieden gehalten, unter Schutz vor CO_2-Zutritt abgekühlt und mit 0,1 n NaOH titriert (Phenolphthalein als Indicator). Die stark gefärbten Anioneneffluate der bereits geröteten Kirschen konnten auf diese Weise nicht hinreichend genau titriert werden; mangels eines scharfen Umschlages, der sich über 1—2 ml 0,1 n NaOH hinzog, könnten Fehler bis zu 100% entstanden sein.

Die vom Anionenaustauscher festgehaltenen Säuren eluierten wir mittels 150 ml 1 n Ammoniumcarbonatlösung und erhielten damit das „Anioneneluat". Nach Zusatz einer Menge an 0,5 n $NaHCO_3$-Lösung, welche der auf die Anionenaustauschersäule aufgegebenen Säuremenge (berechnet aus dem Wert des 1. Kationeneffluates) äquivalent war, und eines Überschusses an $NaHCO_3$ von 5% engten wir das Anioneneluat auf dem Wasserbad (Temperatur der Lösung 70—75° C) auf etwa 5 ml ein, spülten den Rückstand mit Wasser quantitativ in ein 10 ml-Meßkölbchen über und füllten zur Marke mit Wasser auf („Endextrakt").

Ein aliquoter Anteil des Endextraktes wurde durch eine Kationenaustauschersäule (Lewatit KSB, H-Form) geschickt und die Säule mit Wasser nachgewaschen. Effluat und Waschwasser wurden vereint („2. Kationeneffluat"), 2 min lang in schwachem Sieden gehalten, unter Schutz vor CO_2-Zutritt abgekühlt und mit 0,1 n NaOH titriert (Phenolphthalein als Indicator).

Der Rest des Endextraktes wurde in ein Reagensglas eingeschmolzen, fraktioniert sterilisiert (im Abstand von 2 Tagen je 10 min bei 100° C) und in dieser Form bis zum Zeitpunkt der chromatographischen Analyse aufbewahrt.

2. Säulenchromatographische Analyse

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen über die organischen Säuren von Bananen und Citrusfrüchten (Wolf 1958a, b) benutzten wir auch hier das von Bulen u. a. (1952) für das Übersichtschromatogramm angegebene Verfahren in leicht abgeänderter Form. So verminderten wir die Konzentration der zum Sättigen des Kieselgels und der Elutionsflüssigkeiten verwandten H_2SO_4-Lösung von 0,5 auf 0,05 n.

a) Bereitung der Säule. Kieselgel („Merck" für chromatographische Analyse) wurde von feineren Partikeln durch Schlämmen mit Wasser

befreit und nach ISHERWOOD (1946) mit Salzsäure, Wasser, angesäuertem Alkohol und Äther gewaschen; das lufttrockene Pulver wurde über P_2O_5 im Vakuumexsiccator, in kleineren verschlossenen Gläsern abgepackt, aufbewahrt.

Grundsäule. 7,8 g Kieselgel wurden in einem in Wasser von Zimmertemperatur hängenden 50 ml-Becherglas unter sorgfältigem Rühren mit einem Glasstab vorsichtig mit 0,05 n H_2SO_4 versetzt, bis die Masse *eben* zu klumpen begann; nun setzten wir noch 0,2 g Kieselgel zu, verrührten und schwemmten das frei fließende Pulver mit 25 ml Chloroform (mit 0,05 n H_2SO_4 zuvor gesättigt) zu einem dünnflüssigen homogenen Brei an. Dieser wurde luftblasenfrei in die am unteren Ende mit einem mit Chloroform getränkten Wattepfropfen abgeschlossene chromatographische Röhre gefüllt. Die abgesetzte Kieselgelmasse wurde angedrückt und mit einer Scheibe von Filtrierpapier abgedeckt. Das Chloroform wurde am Auslauf der Röhre so weit abgelassen, daß über der Kieselgelsäule eine etwa 5 cm hohe Schicht von Chloroform verblieb. Diese Grundsäule war im Mittel 25 cm hoch.

Probensäule. Ein aliquoter Anteil des „Endextraktes" wurde in einem 25 ml-Becherglas nach Zusatz von 1 Tropfen Thymolblaulösung auf dem Wasserbad eben bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde unter Kühlung mit Eiswasser in 0,3 ml einer H_2SO_4-Lösung aufgenommen, deren Stärke so bemessen war, daß außer der den vorhandenen Na-Salzen äquivalenten Menge noch ein Überschuß von 0,02 mVal H_2SO_4 vorhanden war. Die Lösung der organischen Säuren wurde sorgfältig mit 0,5 g Kieselgel verrührt und das trockene Gemisch unter Verwendung eines Wattetupfers quantitativ in das über der Grundsäule befindliche Chloroform übergeführt; eingeschlossene Luftblasen wurden durch Umrühren entfernt. Die Probensäule wurde mit Filterblättchen bedeckt, angedrückt und schließlich mit dem zum Auswischen des Bechergläschens verwendeten Wattetupfer abgeschlossen[1].

[1] Um Verluste an flüchtigen Säuren auf ein Mindestmaß zu reduzieren, gaben wir in später durchgeführten Versuchen die Probe in folgender Weise auf die Grundsäule auf:

Der, wie oben angegeben, in einem 25-ml-Becherglas (1) zur Trockne gedampfte aliquote Anteil des „Endextraktes" wurde in 0,15 ml dest. Wasser gelöst und mit 0,25 g Kieselgel sorgfältig verrührt. Die trockene Masse wurde in 5 ml Chloroform suspendiert, das zuvor mit 0,05 n-H_2SO_4 gesättigt worden war. In ein anderes 25 ml-Becherglas wurden 0,15 ml einer H_2SO_4-Lösung pipettiert, deren Stärke so bemessen war, daß außer der den vorhandenen Na-Salzen äquivalenten Menge noch ein Überschuß von 0,02 mVal H_2SO_4 vorhanden war. Diese H_2SO_4-Lösung wurde mit 0,25 g Kieselgel sorgfältig verrührt, und das resultierende trockene Pulver wurde in das in Becherglas (1) befindliche Chloroform eingerührt. Die gesamte Suspension wurde quantitativ auf die Grundsäule aufgebracht und das Kieselgel der Probensäule, wie oben angegeben, angedrückt und mit einer Scheibe von Filtrierpapier abgedeckt.

b) Elutionsgemische. Zum fraktionierten Eluieren der Säuren verwendeten wir folgende Flüssigkeiten:

1a. 100 ml Chloroform (nur gelegentlich verwendet),
1. 100 ml 5%iges Butanol-Chloroform-Gemisch,
2. 150 ml 15%iges Butanol-Chloroform-Gemisch,
3. 150 ml 25%iges Butanol-Chloroform-Gemisch,
4. 300 ml 35%iges Butanol-Chloroform-Gemisch,
5. 300 ml 60%iges Butanol-Chloroform-Gemisch,
6. 100 ml Äthanol (mit Petroläther vergällt),
7 100 ml Wasser.

Unter % sind Vol.-% zu verstehen.

Butanol und Äthanol waren durch einstündiges Kochen am Rückflußkühler in Gegenwart von Kaliumcarbonat and anschließendes fraktioniertes Destillieren säurefrei gemacht worden. Die Elutionslösungen wurden vor Verwendung mit 0,1 Vol. 0,05 n H_2SO_4 im Scheidetrichter geschüttelt und die organischen Phasen durch Filtrieren über ein trockenes Faltenfilter von allenfalls vorhandenen Tröpfchen der H_2SO_4-Lösung befreit.

c) Durchführung der Fraktionierung. Die Elutionsflüssigkeiten wurden mit Hilfe von Preßluft (Stahlflasche) durch die Säule gedrückt; der Druck wurde regelbar konstant gehalten durch Verwendung eines einstufigen Regulierventils und eines nach dem Vorschlag von MADER u. MADER (1952) gebauten Druckreglers. Es wurden mit Hilfe eines Syphons Fraktionen zu 3,3 ml aufgefangen (Austrittgeschwindigkeit etwa 80 ml/h). Diese wurden nach Zusatz von 10 ml CO_2-freiem dest. Wasser, das mit Thymolblau angefärbt war, unter Durchleiten von CO_2-freier Luft mit 0,02 n NaOH auf zartblau titriert. Die austitrierten Gemische chromatographisch zusammengehöriger Fraktionen wurden vereinigt; die von der organischen Phase im Scheidetrichter abgetrennten wäßrigen Lösungen wurden im belüfteten Trockenschrank bei etwa 50° C eingeengt.

In den mit 60%igem Butanol-Chloroformgemisch eluierten Fraktionen wurde anorganisches Phosphat photometrisch bestimmt (Ausschütteln des gelben Phosphorsäure-Molybdänsäure-Komplexes mittels Butanol und Reduktion zu Molybdänblau mittels Zinn(II)-Chlorid).

Das mit Äthanol und mit Wasser erhaltene Eluat wurde *in toto* aufgefangen, mit 0,1 n NaOH neutralisiert, im belüfteten Trockenschrank bei etwa 50° C auf ca. 20 ml eingeengt und durch eine Kationenaustauschersäule geschickt, die bis zur Säurefreiheit nachgewaschen wurde. Effluat und Waschwasser wurden vereinigt („3. Kationeneffluat"), für 2 min am Sieden gehalten und nach Abkühlen mit 0,1 n NaOH gegen Phenolphthalein titriert. Die neutralisierte Lösung wurde mit HCl angesäuert (Endkonzentration 0,1 n) und die in der Lösung enthaltene Schwefelsäure mittels $BaCl_2$ heiß gefällt und als $BaSO_4$

gravimetrisch bestimmt. Die Differenz zwischen Titrationswert vor der Sulfatfällung und ermitteltem SO_4-Wert wurde als Maß für andere vorhandene Säuren als Schwefelsäure angesehen; da der H_2SO_4-Anteil des 3. Kationeneffluates sehr hoch ist (im Mittel etwa 96%), wird der Differenzwert keine hohe Genauigkeit beanspruchen dürfen.

Hinsichtlich der quantitativen Genauigkeit der Fraktionierung an der Kieselgelsäule muß berücksichtigt werden, daß die ermittelten Werte durch die Titrationsfehler der erheblichen Zahl der Einzeltitrationen belastet sind. Es verwundert deshalb nicht, daß die Gesamtsumme der aus der Kieselgelsäule eluierten Säuren zu 92 bis 105 Prozent der auf die Säule aufgegebenen Säuremenge (2. Kationeneffluat) gefunden wurde.

3. Papierchromatographische Prüfung

Anteile der gruppenweise vereinten und eingeengten wäßrigen Phasen der austitrierten Gemische wurden papierchromatographisch geprüft. Soweit nicht Gründe dagegen sprachen, wurden die als Salze vorliegenden Säuren mittels Kationenaustauscher in Freiheit gesetzt. In einigen Fällen war es notwendig, die zu prüfenden Lösungen von Schwefelsäure zu befreien. Das Chromatographierpapier (Schleicher und Schüll 2043b, mit Salz- und Flußsäure gewaschen) wurde vor der Verwendung mit 80%igem Äthanol gewaschen; ein solches Waschen empfiehlt sich vor allem dann, wenn ammoniakalische Silbernitratlösung zum Nachweis der Säureflecke verwendet wird. Als Lösungsmittelgemisch verwendeten wir in Anlehnung an KALBE (1954) meist ein Gemisch aus 75 ml Äthanol (96 Vol.-%, mit Petroläther vergällt, über K_2CO_3 destilliert) und 25 ml Ammoniak(3n)-Ammoniumcarbonat(1,5n)-Puffer. Zum Nachweis der Säureflecke diente sowohl Methylrot-Boratpuffer nach KALBE (1954) als auch ammoniakalische Silbernitratlösung nach BROWN (1951).

Flüchtige Säuren, insbesondere Essigsäure, wurden bevorzugt als Äthylaminsalz chromatographiert, wobei wir uns auf die Erfahrungen von MEHLITZ u. MATZIK (1956) stützten.

Oxyzimtsäure und ihre Derivate wurden mittels eines Gemisches aus n-Butanol/Essigsäure/Wasser (= 4/1/5 Vol.) papierchromatographisch getrennt (vorzugsweise unter Verwendung der Streifen von MATTHIAS 1954) und die Substanzflecke unter der UV-Lampe lokalisiert. Wichtige Hinweise auf die Art der vorliegenden Verbindung ergab die Farbveränderung nach Bedampfen mit NH_3.

Ergebnisse

1. Papierchromatographische Prüfung der säulenchromatographisch gewonnenen Fraktionsgruppen (wegen der Bezeichnungen vgl. Tabelle 3—5)

Hinsichtlich der Ermittlung der in den einzelnen Fraktionsgruppen vorliegenden Säuren mußten wir uns Beschränkungen auferlegen. Nicht in allen Fällen ermöglichen es uns die auf chromatographischem Wege

Tabelle 3. *Veränderungen der Mengen (mVal je 100 g Fruchtgewicht) der durch Behandlung mit Ionenaustauschern und durch Chromatographie an Kieselgel fraktionierten Säuren der Süßkirsche im Verlauf der Fruchtentwicklung*

Lfd. Nr.	In der Fraktionengruppe wurde u. a. angetroffen	Fraktionen-Nr. der Gipfelwerte	Bezeichnung der Proben									
			A	B	C	D	E	F	G	I	K	
			mVal je 100 g Fruchtgewicht									mVal je 100 g Fruchtfleisch
1	unbekannte Säure	5–7	0,25	0,19	0,13	0,05	0,06	0,09	0,04	0,05	0,05	0,06
2	Essigsäure	12–17	0,19	0,18	0,15	0,16	0,07	0,09	0,21	0,15	0,10	0,12
3	Ameisensäure	33–35	0,66	0,39	0,26	0,38	0,21	0,22	0,27	0,23	0,14	0,16
4	Bernsteinsäure	47–51	0,16	0,10	0,13	0,15	0,27	0,29	0,30	0,29	0,24	0,27
5	trans-Aconitsäure	63–69	0,12	0,15	0,08	0,12	0,05	nicht best.	0,06	0,04	0,04	0,04
6	—	78–83	0,05	0,10	0,02	0,01	—		0,04	Spur	0,03	0,03
7	—	88–93	0,07	0,03	0,03	0,07	0,02	0,03	0,05	0,04	Spur	Spur
8	—	101–103	0,17	0,06	0,04	0,09	Spur	0,01	0,02	0,02	Spur	Spur
9	—	109–111	0,06	0,06	0,03			—	—	—	—	
10	Äpfelsäure	125–130	4,66	3,73	3,91	5,03	7,65	11,84	12,28	13,62	10,93	12,07
11	Citronensäure	155–165	0,63	0,30	0,32	0,24	0,23	0,28	0,23	0,08	0,03	0,03
12	—	195–205	0,13	0,06	0,08	0,05	0,09	0,05	0,04	0,07	0,14	0,16
13	—	239–245	0,09	—	0,07	0,09	0,11	0,09	0,15	0,16	0,11	0,12
14	2/3 H_3PO_4 + „X“	250–265	3,17	1,56	1,40	1,64	1,58	1,15	1,27	0,89	0,53	0,59
15	2/3 H_3P_4		1,42	0,80			1,33	0,93	0,95	0,65	0,22	0,24
16	„X“		1,75	0,76			0,25	0,22	0,32	0,24	0,31	0,35
17	Alkohol-Wasser-Eluat (nach Abzug von H_2SO_4)		1,34	0,59	0,00	0,66	0,14	0,28	0,62	0,22	0,49	0,54
18	2/3 H_3PO_4		0,03	0,04	0,01	0,01	0,06	0,01	0,06	0,04	0,04	0,04
19	Gesamtphosphor in 17 (als 3/3 H_3PO_4)		0,26	0,08	0,04	0,04	0,15	0,02	0,10	0,15	0,09	0,10
20	Σ 1—14, 17		11,75	7,50	6,65	8,85	10,47	14,39	15,63	15,85	12,83	14,19
21	1. Kationeneffluat (Gesamtsäure)		15,47	10,24	11,41	12,50	14,53	16,93	17,87	15,33	13,69	
22	2. Kationeneffluat		11,18	8,05	7,15	9,24	11,25	15,63	16,67	15,76	13,04	
23	Anioneneffluat		2,17	1,02	3,75	2,79	3,50	1,81	0,76	0,65	0,49	
25	Anioneneffluat + 2. Kationeneffluat		13.35	9,07	10,90	12,03	14,75	17,44	17,43	16,41	13,53	
26	20 in % von 22		105,1	93,2	93,0	95,8	93,0	92,1	93,7	103,3	98,3	
27	25 in % von 21		86,3	88,6	95,6	96,2	101,5	103,0	97,6	107,0	98,9	

Tabelle 4. *Veränderungen der Mengen (mVal je 100 Früchte) der durch Behandlung mit Ionenaustauschern und durch Chromatographie an Kieselgel fraktionierten Säuren der Süßkirsche im Verlauf der Fruchtentwicklung*

Lfd. Nr.	In der Fraktionengruppe wurde u. a. angetroffen	Fraktionen-Nr. der Gipfelwerte	Bezeichnung der Proben								
			A	B	C	D	E	F	G	I	K
			mVal je 100 Früchte								
1	unbekannte Säure	5—7	0,022	0,14	0,12	0,17	0,07	0,09	0,26	0,16	0,26
2	Essigsäure	12—17	0,017	0,13	0,14	0,17	0,08	0,14	0,60	0,67	0,60
3	Ameisensäure	33—35	0,059	0,28	0,25	0,40	0,26	0,35	0,77	1,04	0,84
4	Bernsteinsäure	47—51	0,014	0,07	0,12	0,16	0,33	0,46	0,86	1,25	1,40
5	trans-Aconitsäure	63—69	0,011	0,11	0,07	0,12	0,06	nicht best.	0,17	0,16	0,23
6	—	78—83	0,005	0,07	0,02	0,01	—		0,13	Spur	0,17
7	—	88—93	0,006	0,02	0,03	0,08	0,02	0,05	0,15	0,18	Spur
8	—	101—103	0,015	0,04	0,04	0,10	Spur	0,02	0,07	0,10	Spur
9	—	109—111	0,006	0,05	0,02			—	—	—	—
10	Äpfelsäure	125—130	0,418	2,71	3,62	5,24	9,30	18,32	35,35	59,30	63,10
11	Citronensäure	155—165	0,056	0,22	0,30	0,25	0,29	0,45	0,66	0,33	0,18
12	—	195—205	0,012	0,04	0,08	0,06	0,11	0,08	0,12	0,29	0,81
13	—	239—245	0,009	—	0,07	0,10	0,14	0,14	0,42	0,69	0,65
14	2/3 H_3PO_4 + „X“	250—265	0,285	1,13	1,30	1,71	1,93	1,84	3,66	3,87	3,06
15	2/3 H_3PO_4		0,128	0,58			1,62	1,49	2,74	2,83	1,27
16	„X“		0,157	0,55			0,31	0,35	0,92	1,04	1,79
17	Alkohol-Wasser-Eluat (nach Abzug von H_2SO_4)		0,120	0,43	0,0	0,69	0,17	0,45	1,78	0,94	2,82
18	$\sum 1—14, 17$		1,055	5,44	6,18	9,26	12,76	22,39	45,00	68,98	74,12
19	1. Kationeneffluat		1,390	7,43	10,53	13,06	17,65	27,00	51,45	66,70	79,00
20	2. Kationeneffluat		1,004	5,84	6,60	9,66	13,67	24,90	48,00	68,60	75,30
21	Anioneneffluat		0,195	0,74	3,46	2,91	4,25	2,89	2,19	2,83	2,83

erhaltenen Hinweise, die Art der oft nur in sehr geringen Mengen angetroffenen Säuren zu erkennen.

Eine Anzahl der säulenchromatographischen Fraktionengruppen ist nicht einheitlicher Natur, und mehrere der Komponenten blieben uns unbekannt. Wir besprechen deshalb nur die uns wichtiger erscheinenden Gruppen und geben sie mit ihrem Gipfelwertbereich an, Fraktionengruppe 47—51 bedeutet also, daß alle Einzelfraktionen zu je 3,3 ml zusammengefaßt wurden, deren Titrationswerte im Diagramm einen

Tabelle 5. *Veränderungen des prozentualen Anteils der einzelnen Fraktionengruppen an der Gesamtmenge der aus der Kieselgelsäule eluierten Säuren der Süßkirsche im Verlauf der Fruchtentwicklung*

Lfd. Nr.	In der Fraktionengruppe wurde u. a. angetroffen	Fraktionen-Nr. der Gipfelwerte	Bezeichnung der Proben: A	B	C	D	E	F	G	I	K
			Prozentueller Anteil der Fraktionen an der Gesamtsäure (auf Basis mVal)								
1	unbekannte Säure	5—7	2,08	2,53	1,95	1,81	0,48	0,42	0,58	0,25	0,35
2	Essigsäure	12—17	1,61	2,40	2,26	1,81	0,66	0,63	1,34	0,95	0,81
3	Ameisensäure	33—35	5,60	5,20	3,91	4,29	2,01	1,53	1,73	1,45	1,13
4	Bernsteinsäure	47—51	1,33	1,33	1,95	1,69	2,58	2,01	1,92	1,83	1,89
5	trans-Aconitsäure	63—69	1,04	2,00	1,20	1,36	0,48	nicht best.	0,38	0,25	0,31
6	—	78—83	0,47	1,33	0,30	0,11	—		0,26	Spur	0,23
7	—	88—93	0,57	0,40	0,45	0,79	0,19	0,21	0,32	0,25	—
8	—	101—103	1,42	0,80	0,60	1,01	Spur	0,07	0,13	0,13	—
9	—	109—111	0,57	0,80	0,45			—	—	—	—
10	Äpfelsäure	125—130	39,63	49,75	58,80	56,80	73,04	82,28	78,55	85,93	85,14
11	Citronensäure	155—165	5,31	4,00	4,83	2,71	2,20	1,94	1,47	0,50	0,24
12	—	195—205	1,14	0,80	1,20	0,56	0,86	0,35	0,26	0,44	1,09
13	—	239—245	0,85	—	1,05	1,02	1,05	0,63	0,96	1,01	0,88
14	2/3 H_3PO_4 + „X“	250—265	27,00	20,80	21,05	18,54	15,09	7,99	8,13	5,62	4,13
15	2/3 H_3PO_4		12,13	10,66			12,70	6,46	6,08	4,10	1,71
16	„X“		14,87	10,13			2,39	1,53	2,05	1,52	2,42
17	Alkohol-Wasser-Eluat (nach Abzug von H_2SO_4)		11,38	7,87	—	7,51	1,36	1,94	3,97	1,39	3,80
18	$\sum$ 1—14, 17		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

„Berg“ bilden, dessen Gipfel bei der Analyse der Proben A—K im Bereich der Fraktionen Nr. 47 und Nr. 51 lag.

1. Fraktionengruppe 5—7. Die Säure blieb uns unbekannt. Von Säuren, die vor Essigsäure aus der Kieselgelsäule eluiert wurden, kommen u. a. die auf Essigsäure folgenden homologen Fettsäuren in Frage, weiterhin ungesättigte Monocarbonsäuren, wie Sorbinsäure, und ferner gewisse aromatische Säuren, wie Benzoesäure, Salicylsäure, Syringasäure. Daß die hier erfaßte Fraktion nicht Benzoe- oder Salicylsäure enthält, ergab sich aus ihrer Position im Säulenchromatogramm: wird die Elution mit 100 ml Chloroform eröffnet, so treten diese beiden Säuren mit Sicherheit aus. Unsere unbekannte Säure erschien unter diesen Bedingungen nicht, sondern erst mit 5%igem Butanol-Chloroformgemisch. Weiterhin läuft die unbekannte Säure im Papierchromato-

gramm mit ammoniakalischem Äthanol-Wasser-Gemisch deutlich langsamer als Salicylsäure und Propionsäure, und zwar mit dem gleichen R_F-Wert wie Adipinsäure (ca. 0,50). Adipinsäure kommt indes nicht in Frage, denn sie tritt im Säulenchromatogramm erst nach Essigsäure aus, und ihre Flecken sind nach dem Besprühen mit ammoniakalischer $AgNO_3$-Lösung weiß bis gelblich, während diejenigen der unbekannten Säure gelb- bis ockerfarben sind. Der Ausschluß von Salicylsäure erscheint uns erwähnenswert, weil diese Säure für die Kirsche angegeben worden ist (s. MARSHALL 1954, S. 123). Es gibt keine Anzeichen dafür, daß diese Fraktionengruppe aus mehreren Komponenten besteht.

2. Fraktionengruppe 12—17. Im Papierchromatogramm ergibt diese Gruppe als Äthylaminsalz nur einen Fleck vom gleichen R_F-Wert wie Essigsäure.

3. Fraktionengruppe 33—35. Die Säure dieser Gruppe wandert im Papierchromatogramm mit ammoniakalischem Äthanol-Wasser-Gemisch ebensoweit wie Ameisensäure; außerdem verfärben sich die Flecke beider Säuren nach Besprühen mit ammoniakalischer $AgNO_3$-Lösung in gleicher Weise gelbbraun.

4. Fraktionengruppe 47—51 wurde nach Passieren einer Kationenaustauschersäule mit $Ba(OH)_2$ in der Siedehitze neutralisiert, $BaSO_4$ abfiltriert, das Filtrat erneut durch eine Kationenaustauschersäule geschickt und das Effluat im belüfteten Trockenschrank bei 50° C fast bis zur Trockene eingeengt. Die Proben A, B und C ergaben beim Chromatographieren mit ammoniakalischem Äthanol-Wasser-Gemisch zwei Flecke, deren R_F-Werte mit denjenigen von Milch- und Bernsteinsäure übereinstimmten; im Papierchromatogramm der Proben D—K war nur der mit Bernsteinsäure im R_F-Wert übereinstimmende Fleck wahrzunehmen.

5. Fraktionengruppe 63—69 wurde ebenso verarbeitet wie 4. Sie ergab im Papierchromatogramm (ammoniakalisches Äthanol-Wasser-Gemisch) mehrere Flecke; einer davon stimmte im R_F-Wert mit dem von trans-Aconitsäure erzeugten Fleck überein.

6.—9. Diese Fraktionengruppen wurden nicht näher geprüft, zumal die Säuremengen sehr gering waren und die Wirksamkeit der Trennung an der Säule in diesem Bereich oft zu wünschen übrigließ.

10. Fraktionengruppe 125—130. Sie ergab im Papierchromatogramm mit ammoniakalischem Äthanol-Wasser-Gemisch einen dominierenden Hauptfleck vom gleichen R_F-Wert wie Äpfelsäure (0,35—0,38), daneben aber noch einen weit schwächeren Fleck mit $R_{\ddot{A}}$ [1] = 0,76—0,79 und einen sehr schwachen Fleck mit $R_{\ddot{A}}$ = ca. 1,3.

[1] $R_{\ddot{A}} = \frac{\text{Wanderweg der Substanz}}{\text{Wanderweg von Äpfelsäure}}$.

11. Fraktionengruppe 155—165 ergab einen mit Citronensäure übereinstimmenden Hauptfleck ($R_F = 0{,}16$—$0{,}18$); daneben aber noch einen bedeutend schwächeren Fleck vom gleichen R_F-Wert wie Äpfelsäure. Wir vermuten, daß es sich hierbei um „verschleppte" Äpfelsäure handelt, obwohl die Trennung von Citronen- und Äpfelsäure, nach dem Säulenchromatogramm beurteilt, sehr scharf war.

12. Fraktionengruppe 195—205. Isocitronen- oder Glycerinsäure konnten papierchromatographisch nicht nachgewiesen werden.

13. Fraktionengruppe 239—245. Weinsäure papierchromatographisch nicht nachgewiesen. Vermutlich enthält die Gruppe flüchtige anorganische Säuren (z. B. HCl, HNO_3).

14. Fraktionengruppe 250—265. o-Phosphorsäure papierchromatographisch nachgewiesen und photometrisch bestimmt. Diese Gruppe enthält ferner eine Säure „X", die im Papierchromatogramm mit ammoniakalischem Äthanol-Wasser-Gemisch ebensoweit wandert wie Chinasäure.

15. Alkohol-Wasser-Eluat. Es gelang nicht, auf papierchromatographischem Wege mit ammoniakalischem Äthanol-Wasser-Gemisch eine andere Säure als Schwefelsäure nachzuweisen.

Diese Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß in der Kirsche neben einer Anzahl von noch nicht identifizierten Säuren folgende aliphatische und alicyclische Säuren vorhanden sind: Essig-, Ameisen-, Milch-, Bernstein-, Aconit-, Äpfel-, Citronen- und Chinasäure. Die Mannigfaltigkeit des Säuresortimentes ist offenbar viel erheblicher, als aus bisherigen Untersuchungen erkennbar wurde. Unsere Befunde mahnen zur Vorsicht gegenüber manchen Ergebnissen, die auf papierchromatographischem Wege mit nur einem einzigen Lösungsmittelgemisch ermittelt wurden.

2. Verhalten der Säuren im Verlauf der Fruchtentwicklung

Die zahlenmäßig erhaltenen Befunde geben wir in den Tabellen 3—5 wieder. Bei der Besprechung soll die in Parenthese gesetzte Säurebezeichnung (z. B. „Äpfelsäure") bedeuten, daß diese Fraktion als chromatographisch nicht einheitlich erkannt worden ist.

Die Menge an Gesamtsäure je Frucht nimmt im Verlauf der Fruchtentwicklung laufend zu und erreicht in der vollreifen Frucht einen Wert von rd. 0,8 mVal je Frucht. Bei Bezug auf das Frischgewicht der Gesamtfrucht scheint in sehr frühen Entwicklungsstadien die Säuremenge sich zunächst zu vermindern, bald aber fortlaufend anzusteigen und kurz vor der Vollreife ihren maximalen Wert (ca. 18 mVal je 100 g Frucht) zu erreichen; mit dem Übergang zur Vollreife deutet sich bereits wieder ein Abfall der Säuremenge an.

„Äpfelsäure" erscheint in allen untersuchten Entwicklungsstadien als die vorherrschende Säure. Allerdings ist ihr prozentualer Anteil an der Gesamtsäure in den jüngsten Früchten mit etwa 40% wesentlich niedriger als in den reifen Früchten (ca. 85% der Gesamtsäure). Im Verlauf der Entwicklung steigt sowohl der prozentuale Anteil von „Äpfelsäure" an der Gesamtsäure fortlaufend an als auch die Menge an „Äpfelsäure" je 100 Früchte (0,42→63,1 mVal); dieses Verhalten gilt auch für ihre Menge je 100 g Fruchtgewicht (4,66→10,9 mVal), allerdings mit der Einschränkung, daß beim Übergang von dunkelroter zu schwarzroter Färbung sich ein Abfall andeutet.

Quantitativ bedeutsam sind neben Äpfelsäure vor allem in frühen Stadien die Säuren der Fraktionengruppe 250—265 („Phosphorsäure + Säure X"). Der prozentuale Anteil dieser Fraktion an der Gesamtsäure und ihre Menge je 100 g Fruchtgewicht fallen im Verlauf der Entwicklung fortlaufend ab (27,0→4,13 mVal/100 mVal Gesamtsäure, bzw. 3,17→0,53 mVal je 100 g Fruchtgewicht; ihre Menge je Frucht aber vermehrt sich, bis die Frucht dunkelrot gefärbt ist. Von den Komponenten dieser Fraktion wurde Phosphorsäure photometrisch bestimmt und der Differenzbetrag als Säure „X" erfaßt. Säure „X" stellt offenbar vorwiegend, wenn nicht ausschließlich, Chinasäure dar. Die beiden Komponenten verhalten sich im Verlauf der Fruchtentwicklung ähnlich wie die Gesamtfraktion.

Anteilmäßig an dritter Stelle folgt, wenn wir die in frühen Stadien erhaltenen Befunde zugrunde legen, die mit Alkohol und Wasser ganz zuletzt aus der Kieselgelsäule eluierte Säurefraktion. Wir haben schon oben erwähnt, daß die ermittelten Werte aus methodischen Gründen ziemlich ungenau sein können. Es sei deshalb nur ausgesagt, daß sich der prozentuale Anteil dieser Fraktion an der Gesamtsäure im Verlauf der Fruchtentwicklung anscheinend vermindert, daß ihre Menge je Frucht aber ansteigende Tendenz aufweist.

In jungen, noch grünen Früchten sind ferner die Anteile an der Gesamtsäure bei den Fraktionengruppen 33—35 („Ameisensäure") und 155—165 („Citronensäure") bemerkenswert (4 bis über 5%), beachtlich (bis zu 2,5%) auch diejenigen der Gruppe 5—7 (unbekannte Säure); im Verlauf der Reifung vermindert sich die Größe dieser Anteile erheblich. Die Mengen je Frucht aber durchlaufen im Verlauf der Fruchtentwicklung Maxima, und zwar die Säuren der Fraktionengruppe „Ameisensäure" anscheinend im Stadium der Dunkelrotfärbung, diejenigen der Fraktionengruppe „Citronensäure" bereits während des Errötens. Von den übrigen Fraktionengruppen sei lediglich noch diejenige der „Bernsteinsäure" herausgegriffen, deren Menge je Frucht fortlaufend anwächst, bis die Kirsche sich schwarzrot gefärbt hat; ihr prozentualer Anteil an der Gesamtsäure beträgt in der reifen Frucht etwa 2%.

3. Effluat der Anionenaustauschersäule

Ein gewisses Interesse verdient noch das „Anioneneffluat". Einen Hinweis darauf, um was für saure Substanzen es sich hierbei u. a. handelt, lieferte uns die für Chlorogensäure charakteristische Grünfärbung des mit n$(NH_4)_2CO_3$ erhaltenen Anionen*eluates*; eine solche Verfärbung zeigte sich nach einigem Stehen des Eluates zunächst an der Oberfläche, und sie erfaßte bei längerem Stehen immer tiefere Flüssigkeitsschichten. Aus den Veröffentlichungen von HULME (1953) wußten wir, daß sich Chlorogensäure an einer Anionenaustauschersäule anomal verhalten kann. Wir prüften daraufhin das „Anioneneffluat" papierchromatographisch unter Verwendung eines Butanol-Essigsäure-Wasser-Gemisches und erkannten unter der UV-Lampe, daß auch hier derartige Phenolcarbonsäuren vorliegen. Offenbar ist es so, daß aus unserem ca. 70 Vol.-% Alkohol enthaltenden Extrakt („1. Kationeneffluat") Chlorogen- und verwandte Säuren an einem mit CO_3'' beladenen Anionenaustauscherharz nicht quantitativ adsorbiert werden, sondern die Säule z. T., und zwar mindestens in gewissem Ausmaß unverändert, passieren. Die Beobachtung, daß zumindest ein merklicher Anteil der adsorbierten Phenolcarbonsäuren unter den angewandten Bedingungen mit $(NH_4)_2CO_3$ eluierbar ist, beweist, daß diese empfindlichen Substanzen am Austauscherharz höchstens zu einem Teil oxydativ verändert worden sind. Es deuten sich hier methodische Möglichkeiten an.

Wir wissen noch nicht, in welchem Verhältnis diese Substanzen sich auf Anioneneffluat und Anioneneluat verteilen und in welchem Ausmaß sie verändert werden. Quantitative Auslegung der wegen der starken Eigenfärbung unsicheren Titrationswerte der Anioneneffluate sind deshalb von zweifelhaftem Wert. Da indes die photometrische Auswertung der aus den „1. Kationeneffluaten" von 2 Proben papierchromatographisch abgetrennten (s. unten) Chlorogensäure eine Mengenveränderung in gleicher Richtung aufweist wie die Titrationswerte des Anioneneffluates der einzelnen Proben, darf vermutet werden, daß der Gehalt an diesen Substanzen bei Bezug auf Fruchtgewicht im Verlauf der Reifung abnimmt.

Um Aufschluß über die Art der vorliegenden Phenolcarbonsäure zu erhalten, chromatographierten wir im Vakuum zur Trockene gedampfte und mit wenig 70%igem Alkohol aufgenommene Anteile vom „1. Kationeneffluat" mit dem Gemisch aus Butanol-Eisessig-Wasser. Unter der UV-Lampe wurden zwei blau fluorescierende Flecken (R_F 0,79 und 0,64) erkennbar. Nach Bedampfen mit NH_3 war die Farbintensität des Fleckes mit dem R_F-Wert 0,79 verstärkt, ebenso auch diejenige des Fleckes mit dem R_F-Wert 0,64, der zugleich auch den für Chlorogensäure charakteristischen Farbumschlag nach grüngelb aufwies. Außerdem war nach Bedampfen mit NH_3 ein dritter, schwächer grüngelb

fluorescierender Fleck mit dem R_F-Wert 0,73 sichtbar geworden. Auf einen anderen Streifen (nach MATTHIAS) aufgegebene Kaffee- und Chlorogensäure liefen mit R_F-Werten von 0,82 und 0,75.

Daraus ergibt sich zunächst, daß in der Kirsche neben Kaffee- und wenig „gewöhnlicher" Chlorogensäure in relativ hoher Konzentration eine andere isomere Form von Chlorogensäure vorliegt. Nach den Angaben von DICKINSON u. GAWLER (1954b) handelt es sich hierbei offenbar um Neochlorogensäure, die von diesen Autoren (1954a) in Victoria-Pflaumen, und von CORSE (1953) in Pfirsichen angetroffen worden ist. Trugen wir größere Mengen der Extrakte auf, so erschien ein weiterer schwach blau, nach Bedampfen mit NH_3 gelbgrün fluorescierender Fleck mit einem R_F-Wert von 0,85, der auf Isochlorogensäure hinweist. Unsere Beobachtungen sprechen dafür, daß in der Kirsche ebenso wie in der Victoria-Pflaume alle drei Isomeren der Chlorogensäure vorliegen, wobei Neochlorogensäure mengenmäßig weitaus vorherrscht. Unter der Annahme, daß Neochlorogensäure in der Größe der Molekularextinktion bei 320—325 mμ mit Chlorogensäure ebenso übereinstimmt wie Isochlorogensäure (s. BARNES u. a. 1950), würden sich aus einem spektrophotometrischen Vergleich (RUCKENBROD 1955) der papierchromatographisch abgetrennten und nach kurzer UV-Bestrahlung eluierten Säuren mit Lösungen reiner Chlorogensäure (Roth, Karlsruhe) bzw. Kaffeesäure folgende Konzentrationen (mg je 100 g Fruchtgewicht) für die Kirschen B (F) berechnen lassen: Kaffeesäure 27 (31); Neochlorogensäure 430 (210); Chlorogensäure 77 (25); Isochlorogensäure — (10). Bei der Anwendung dieser Methode ist zu berücksichtigen, daß Isochlorogensäure in Wasser sehr schwer, in Alkohol gut löslich ist. Ergänzend sei bemerkt, daß auf den Chromatogrammen des „1. Kationeneffluates" noch ein im Tageslicht sich schwach grünlich-gelb abzeichnender, im UV-Licht schwach ziegelrot aufleuchtender Fleck mit einem R_F-Wert von 0,93 auftrat, dessen Färbung sich beim Bedampfen mit NH_3 etwas verstärkte. Offenbar handelt es sich hierbei um Chlorophyll oder eines seiner Derivate (z. B. Phaeophytin).

Der Nachweis, daß in der Kirsche Chlorogensäuren in bemerkenswerter Konzentration vorhanden sind, könnte für die Aufklärung der Befunde von GUICHARD (1955) über das Vorkommen einer unbekannten Säure X in Kirschen und in anderen Früchten bedeutsam sein.

GUICHARD fällt zunächst den wäßrigen Extrakt (p_H 7) mit Bleiessig, zersetzt dann den gewaschenen Bleiniederschlag vorsichtig mit H_2SO_4 ($\rightarrow p_H$ 1); das ausfallende Bleisulfat hält kolloidale Substanzen fest. Der Überschuß an freier Schwefelsäure wird entfernt durch Neutralisieren mit NaOH (p_H 8); um die dabei auch gebundenen organischen Säuren wieder in Freiheit zu setzen, wird HCl bis zum p_H-Wert von 1 zugesetzt und die Suspension anschließend filtriert; aus dem Filtrat wird HCl durch Eindampfen über freier Flamme bis auf 2—3 ml, und nach Aufnehmen des Rückstandes mit wasserfreiem Na_2SO_4 durch Halten bei 60° C völlig

entfernt. Die freien nichtflüchtigen organischen Säuren werden aus dem trockenen Pulvergemisch mit Pyridin herausgelöst und auf Papier chromatographiert.

Zur Kritik dieser Methode muß zunächst gesagt werden, daß sie auch Chinasäure erfaßt. Der aus dem Pflanzengewebe stammende Pyridinextrakt wird nicht frei sein von o-Phosphorsäure. Das Eindampfen der wäßrigen Lösung bei über 100° C in Gegenwart einer bis auf ca. 10% ansteigenden Konzentration an Salzsäure erscheint insofern gefährlich, als die als Bleisalze mitausgefällte Chlorogensäure dabei zumindest weitgehend in China- und Kaffeesäure aufgespalten wird; auch einige etwa vorhandene Zuckerphosphate könnten dabei hydrolysiert werden. Das von GUICHARD benutzte Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Methylbenzoat/Ameisensäure = 3/1/0,8 ist nach unseren Erfahrungen nicht in der Lage, Chinasäure von o-Phosphorsäure sauber zu trennen.

GUICHARD gibt an, daß die unbekannte Fraktion X, die im absteigenden Chromatogramm sich in mehrere Flecken auflösen läßt, mit ihrem R_F-Wert von $< 0{,}10$ sich deutlich von o-Phosphorsäure unterscheidet. Die wiedergegebenen Chromatogramme überzeugen nicht davon, daß in den Objekten eine mit Phosphorsäure nicht identische, Phosphorsäure gebunden enthaltende (z. B. Zuckerphosphate) Substanz vorkommt und die unbekannte Substanz X verkörpert. Bereits Weinsäure hat in GUICHARDs Chromatogrammen einen R_F-Wert von nur ca. 0,10; der R_F-Wert von Phosphorsäure muß also noch erheblich kleiner sein. Es erscheint uns dann unmöglich, Phosphorsäure von Substanzen X deutlich zu unterscheiden, die in GUICHARDs Chromatogrammen mit R_F-Werten von 0,04 bis 0,07 laufen. Wir vermuten deshalb, daß die Fraktion X von GUICHARD im wesentlichen ein Gemisch von o-Phosphorsäure und natürlich vorhandener oder künstlich aus Chlorogensäure abgespaltener Chinasäure darstellt. Damit würde auch übereinstimmen, daß diese Fraktion im Verlaufe der Reifung mengenmäßig abnimmt, unter Umständen so stark, daß sie unter den von GUICHARD angewandten Bedingungen nicht mehr nachweisbar ist.

Zusammenfassung

1. Früchte einer Süßkirschensorte („Napoleon" oder nahe verwandte Sorte) wurden im Verlauf ihrer Entwicklung mit Hilfe chromatographischer Methoden auf organische Säuren untersucht. Die alkoholischen Extrakte wurden mit Kationen- und Anionenaustauscherharzen vorgereinigt, die Säuren an einer Kieselgelsäule in Fraktionen zerlegt und diese titrimetrisch bestimmt. Zusammengehörige Fraktionen wurden papierchromatographisch geprüft.

2. Die Menge an Gesamtsäure je Frucht (in mVal) vermehrt sich im Verlauf der Entwicklung fortlaufend; in der vollreifen, etwa 5,8 g schweren Frucht wurden 0,79 mVal Gesamtsäure angetroffen; als Äpfel-

säure berechnet entspricht dies ca. 0,9% des Gesamtfruchtgewichtes (einschließlich Stein).

3. Die nicht völlig einheitliche Fraktion „Äpfelsäure" herrscht in allen untersuchten Entwicklungsstadien bei weitem vor; ihr prozentualer Anteil an der Gesamtsäure steigt im Verlauf der Entwicklung fortlaufend an und erreicht in reifen Früchten einen Wert von etwa 85% (ca. 12 mVal je 100 g Fruchtfleisch).

4. Einen bemerkenswert hohen Anteil an der Gesamtsäure bestreitet eine Phosphorsäure und Chinasäure enthaltende Fraktion in den frühen Entwicklungsstadien. Die Größe des Anteils dieser Fraktion vermindert sich im Verlauf der Entwicklung fortlaufend (im jüngsten Stadium 27%, in der vollreifen Frucht ca. 4%).

5. Eine nicht identifizierte Fraktionengruppe, die erst nach der Phosphorsäure-Chinasäure-Fraktion aus der Kieselgelsäule eluiert wurde, vermindert sich anteilmäßig ebenfalls im Verlauf der Entwicklung (von etwa 11 auf 4%).

6. Wegen ihrer Menge erwähnenswert sind ferner Fraktionen, die vor allem durch Essigsäure, Ameisensäure, Citronensäure und Bernsteinsäure repräsentiert werden, ferner eine unbekannte Fraktion, die sehr früh aus der Kieselgelsäule austritt.

7. Wir erhielten Hinweise für das Vorliegen von Kaffeesäure und allen drei bisher bekannten Chlorogensäuren, wobei die als Neochlorogensäure anzusprechende isomere Form weitaus dominierte. Die Konzentration an diesen Chlorogensäuren scheint im Verlauf der Entwicklung beträchtlich abzunehmen.

Der technische Teil der Untersuchungen lag in den Händen von Frau DORA DAMMERT und Fräulein BRIGITTE SCHNEIDER, denen ich für ihre Mitarbeit bestens danke.

Literatur

BARNES, H. M., J. R. FELDMAN and W. V. WHITE: J. Amer. chem. Soc. **72**, 4178—4182 (1950). — BIGELOW, W. D., and P. B. DUNBAR: J. industr. engng. Chem. **9**, 762 (1917). Zit. nach MARSHALL 1954. — BOHART, G. S.: Canner **82**, No 11, Part 2, 113 (1936). Zit. nach MARSHALL 1954. — BRIDGES, M. A.: Dietetics for the Clinician, 4. Aufl. Philadelphia: Lea and Febiger 1941. Zit. nach MARSHALL 1954. — BROWN, F.: Nature (Lond.) **167**, 441 (1951). — CALDWELL, J. S.: U.S. Dept. Agric., Techn. Bull. **403** (1934). — CHATFIELD, C., and G. ADAMS: U.S. Dept. Agric., Circ. **549** (1940). Zit. nach MARSHALL 1954. — CORSE, J.: Nature (Lond.) **172**, 771—772 (1953). — DICKINSON, D., and J. H. GAWLER: Chem. and Ind. **1954**, 1583 (1954a). — J. Sci. Food Agric. **5**, 325 (1954b). — FRANZEN, H., u. F. HELWERT: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **122**, 46—85 (1922). — GUICHARD, CL.: Contribution à l'étude de la nature et de l'évolution des acides organiques dans diverses plantes à fruits comestibles. Diss. Bordeaux 1955. — HARTMAN, H., and D. E. BULLIS: Oregon Agric. exp. St., Bull. **247** (1929). Zit. nach MARSHALL 1954. — HERRMANN, K.: Über das Vorkommen von Kaffeesäure und Chlorogensäure im Obst und Gemüse. Naturwissenschaften **43**, 109 (1956). — HULME, A. C.: Biochem. J. **53**, 337—340

(1953). — ISHERWOOD, F. A.: Biochem. J. **40**, 688—695 (1946). — KALBE, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **297**, 19—44 (1954). — KEITT, G. W., E. C. BLODGETT, E. E. WILSON and R. O. MAGIE: Wis. Agric. exp. St., Res. Bull. **132** (1937). Zit. nach MARSHALL 1954. — MADER, CH., and G. MADER: Proc. Oklahoma Acad. Sci. **33**, 229—230 (1952). — MARSHALL, R. F.: Cherries and cherry products. New York and London: Interscience Publ. 1954. — MATTHIAS, W.: Züchter **24**, 313—316 (1954). — MEHLITZ, A., u. B. MATZIK: Fruchtsaft-Industrie **1**, 130—146 (1956). — NELSON, E. K., and A. L. CURL: J. Amer. chem. Soc. **61**, 667—668 (1939). Zit. nach MARSHALL 1954. — RUCKENBROD, H.: Planta (Berl.) **46**, 19—45 (1955). — WINTON, A. L., and K. B. WINTON: The structure and composition of foods. New York: Willey 1935. Zit. nach MARSHALL 1954. — WOLF, J.: Nichtflüchtige Mono-, Di- und Tricarbonsäuren (unter Ausschluß chromatographischer Methoden). In K. PAECH u. M. V. TRACEY (Herausgeb.), Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. II, S. 478—538. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Z. Lebensmitt.-Unters. **107**, 124—131 (1958a). — Fruchtsaft-Industrie (im Druck) 1958b.

Dr. habil. J. WOLF, Karlsruhe, Kaiserstr. 12,
Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung

Planta, Bd. 51, S. 566—574 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

ÜBER DAS SPONTANE AUFTRETEN VON MITOSEN UND INÄQUALEN CYTOKINESEN IN DER ENDOPOLYPLOIDEN EPIDERMIS VON PORTULACA GRANDIFLORA

Von

G. CZEIKA

Mit 6 Textabbildungen

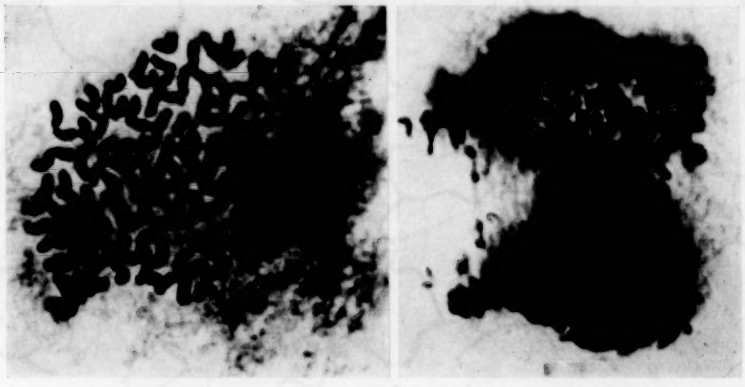
(Eingegangen am 31. Januar 1958)

Gelegentlich vergleichender karyologisch-anatomischer Untersuchungen an einer Reihe von Sukkulenten zeigte es sich (CZEIKA 1956), daß in der endopolyploiden Epidermis alter Blätter von *Portulaca grandiflora* spontane Mitosen ablaufen. Da Endstadien derselben seinerzeit nicht angetroffen wurden und weiters in den meisten Epidermiszellen eine Vermehrung der Kerne bis auf vier zu beobachten war, versuchte ich, diesem eigenartigen Verhalten am Ende der Vegetationsperiode 1957 neuerlich nachzugehen. Aus äußeren Gründen konnte ich meine Untersuchungen erst relativ spät beginnen, so daß ich manche Entwicklungsschritte nicht so eingehend verfolgen konnte, wie es wünschenswert wäre; auch ließen sich experimentelle Eingriffe nicht mehr durchführen. Da sich aber einige interessante neue Tatsachen ergaben, ist es wohl wert, sie im folgenden darzustellen[1].

Im Zuge meiner seinerzeitigen Untersuchungen konnte ich feststellen, daß das Wachstum durch Zellteilung in der Blattepidermis nur kurze Zeit anhält. Sehr bald wird die Mitosetätigkeit eingestellt und somit die Anzahl der Zellen festgelegt. Während des späteren Wachstums der Blätter erfolgt die Vergrößerung der Oberfläche allein durch das Heranwachsen der Epidermiszellen (vgl. CZEIKA 1956, Abb. 7). Gleichzeitig damit kommt es zu einer Polyploidisierung der Zellkerne, wobei der Grad der Polyploidie von den diploid bleibenden Schließzellen gegen die am weitesten von den Stomata entfernt liegenden Zellen ansteigt. Als höchste Stufe der Polyploidisierung wurde 64-Ploidie beobachtet. In den voll entwickelten Blättern der Pflanze fanden sich in den Epidermiszellen, wie bereits erwähnt, häufig mehrere mitotisch entstandene Kerne vor; an die Mitosen anschließende Cytokinesen oder deren Resultate wurden seinerzeit nicht beobachtet.

[1] Alle Untersuchungen wurden an Handschnitten durchgeführt, die in Alkohol-Eisessig (3:1) fixiert und mit Essigkarmin gefärbt worden waren. Zumeist wurden mit Hilfe von Euparal Dauerpräparate hergestellt.

Die neuerliche Untersuchung ergab so wie die frühere bei Pro- und Metaphasen der spontanen Mitosen keine Abweichungen vom normalen Mitose-Ablauf (Abb. 1a). Leider fand sich in dem gesamten zur Verfügung stehenden Material nur eine einzige Anaphase; sie wies zwischen den Chromosomen der Tochterhälften „Brücken" auf (Abb. 1b). Bei diesen „Brücken", die auch an einer mittleren Telophase beobachtet wurden, handelt es sich offensichtlich nur um Verklebungen („stickiness"). Jedenfalls können sie keine wesentlichen Störungen des Teilungsgeschehens darstellen, da in späten Telophasen, die mir reichlich vor-



a b

Abb. 1a u. b. *Portulaca grandiflora.* a 16-ploide spontane Metaphase; b Spontane polyploide Anaphase, beide aus Epidermiszellen alter Blätter. Alkohol-Eisessig, Essigkarmin. Phot. Vergr. 1500fach

lagen, keinerlei Unregelmäßigkeiten auftraten. Über bemerkenswerte Größenunterschiede der Ruhekerne, die sich nach der Cytokinese einstellen, wird noch weiter unten zu berichten sein.

Jede Kernteilung hat nämlich eine Zellteilung zur Folge. Und zwar werden zumeist durch uhrglasförmige Wände relativ kleine Zellen im Inneren der Epidermiszellen abgegrenzt. In der Regel liegen diese Sekundärzellen, wie ich sie im folgenden nennen möchte, der Außenwand der Mutterzelle (= Primärzelle[1]) an. Zunächst bildet sich eine erste Sekundärzelle ungefähr in der Mitte der Außenwand der Mutterzelle, dann eine zweite neben oder teils unter der ersten, und weiterhin kann eine größere (bis zu 12 Zellen umfassende) Ansammlung von unter- und nebeneinandergefügten Sekundärzellen zustande kommen (Abb. 2a, mittlere Zelle, links und rechts unten). Seltener liegen die Sekundärzellen der Innenwand und den Antiklinen der Mutterzellen an (Abb. 2d, e; aus Abb. 2e geht übrigens hervor, daß auch subepidermale Mutterzellen

[1] Als Primärzelle wird im folgenden auch die Mutterzelle *nach* Abgliederung einer kleinen Sekundärzelle bezeichnet.

gelegentlich Sekundärzellen abgliedern). Hie und da zerlegen sich die Mutterzellen auch in zwei oder drei gleichwertige, gleich große Tochter-

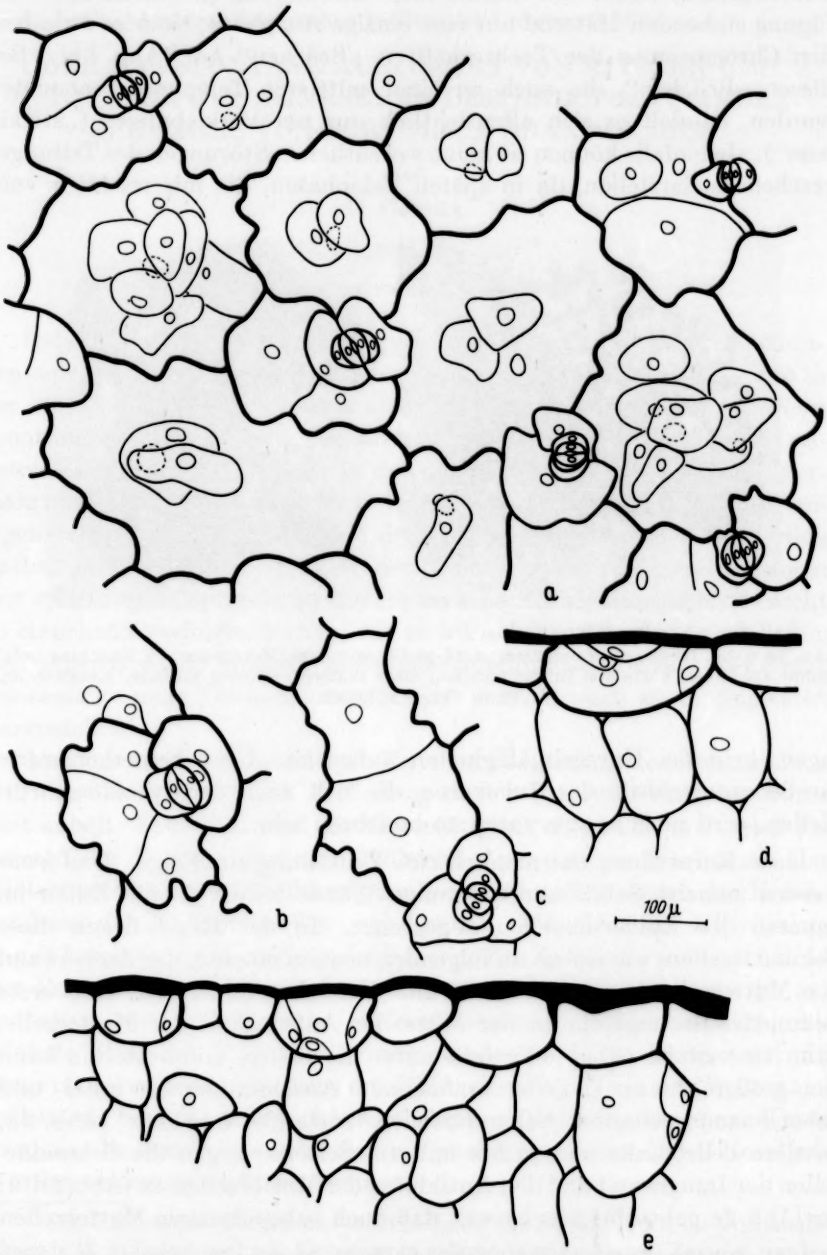


Abb. 2a—e. *Portulaca grandiflora*. a Blattepidermis im Flächenbild, zahlreiche Sekundärzellen zeigend; b und c Zerlegung der Epidermiszellen in 2 bzw. 3 gleichwertige Tochterzellen; d und e Blattlängsschnitte, Sekundärzellen in der Epidermis und bei e auch in einer subepidermalen Zelle. Alkohol-Eisessig, Essigkarmin, Euparal

zellen durch Einschaltung mehr oder minder ebener, quer zur Längsachse stehender Wände (Abb. 2 b, c). Dies kann ohne bzw. vor und nach der Bildung kleiner Sekundärzellen stattfinden. Die Zellwände der Sekundärzellen sind sehr dünn; sie setzen in spitzem Winkel an die Außenwand der Mutterzelle an und sind aus diesen Gründen oft schwer zu erkennen; starke Anfärbung des Cytoplasmas mit Karmin-Essigsäure zeigt sie jedoch als zarte Aussparungen; über ihr regelmäßiges Vorkommen kann kein Zweifel bestehen.

Was die Größe der resultierenden Tochterzellen betrifft, so ergibt sich aus dem Gesagten, daß in den Epidermiszellen in der Regel inäquale und

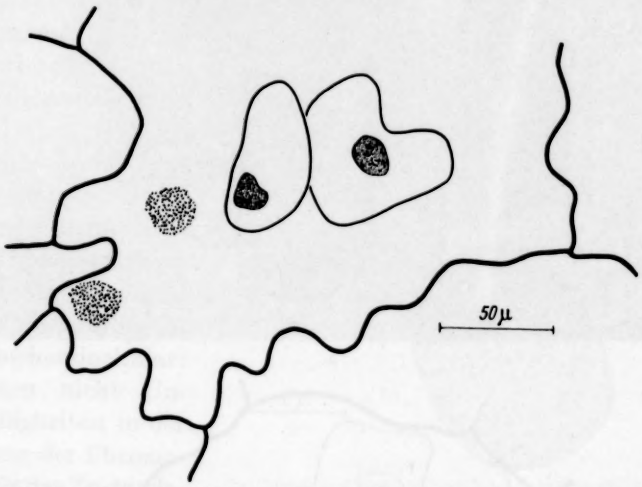


Abb. 3. *Portulaca grandiflora*. Telophase in einer Epidermiszelle, die bereits 2 Sekundärzellen abgegliedert hat (vgl. im einzelnen den Text). Alkohol-Eisessig, Essigkarmin, Euparal

nur selten äquale Teilungen stattfinden. Die Ungleichwertigkeit von Primär- und Sekundärzellen äußert sich aber auch noch in anderen Merkmalen. Die kleine Tochterzelle enthält nämlich — nach der Färbbarkeit mit Karmin-Essigsäure zu schließen — relativ viel und dichtes Cytoplasma, die große dagegen relativ wenig und weniger dichtes Cytoplasma. Bei den äqualen Teilungen wird das Cytoplasma dagegen in gleichem Maß auf die Tochterzellen verteilt. Diese Verhältnisse zeigen nun auch ganz bestimmte Rückwirkungen auf die Zellkerne.

Während bei äqualer Zellteilung Tochterkerne von gleicher Größe und gleichem Bau entstehen, führt die inäquale Zellteilung zu einer verschiedenartigen Entwicklung der Tochterkerne. Die Kerne der kleinen Sekundärzellen sind nämlich durchgehend beträchtlich kleiner und dichter strukturiert als die Kerne, die in den Primärzellen verbleiben. Diese Unterschiede kommen offenbar erst *nach* der Cytokinese *allmählich* zustande, denn während der mittleren Telophase stimmen die beiden Tochterplatten in Größe und Dichte noch völlig überein (Abb. 3).

Unmittelbar nach der Cytokinese zeigen sich an manchen Kernpaaren in später Telophase bereits leichte Unterschiede, indem derjenige der kleinen Sekundärzelle etwas dichter gebaut ist (Abb. 4), doch stimmen in anderen

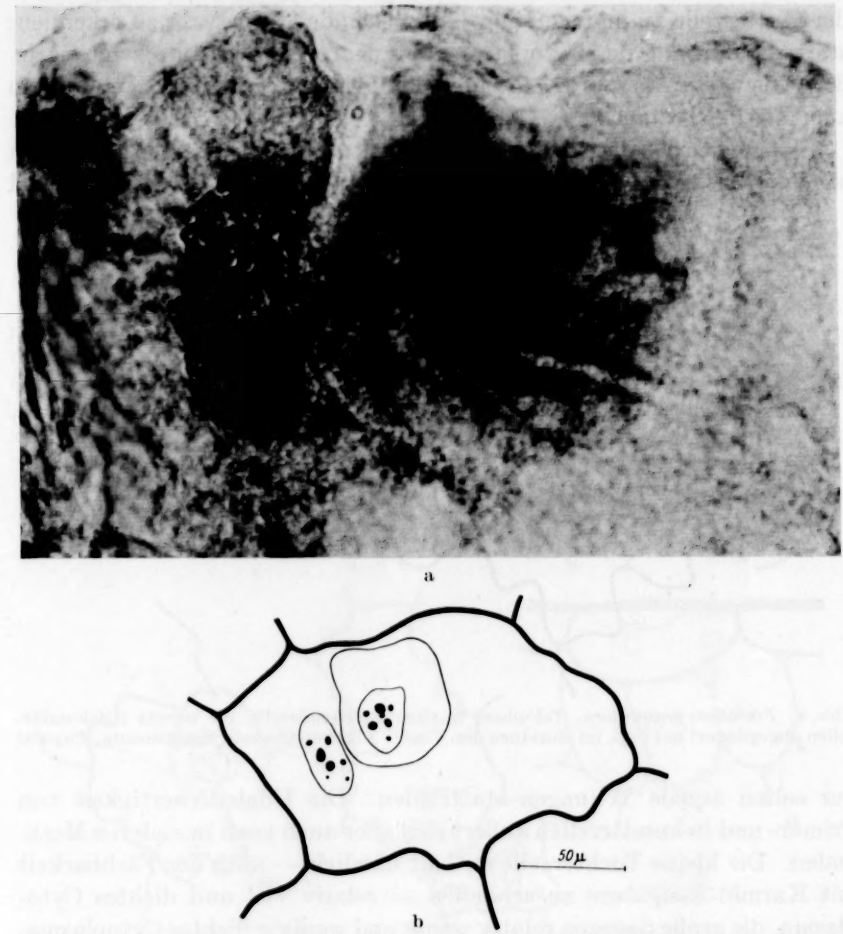


Abb. 4a u. b. *Portulaca grandiflora*. Epidermiszelle mit einer Sekundärzelle, der Zellkern der letzteren bereits dichter strukturiert. (a Photo Vergr. 950fach; b Umrißzeichnung; der Kern der Sekundärzelle liegt in diesem Fall nur wenig höher als der der Primärzelle; der letztere hat sich nach der Cytokinese vermutlich etwas verschoben.) Alkohol-Eisessig, Essigkarmin, Euparal

Fällen auch noch während der Wiederherstellung der Ruhkernstruktur die beiden Schwesterkerne in Größe und innerem Bau überein (Abb. 5c). Weiterhin behält aber nur der in der großen Tochterzelle verbleibende Kern die Größe desjenigen der Mutterzelle und gleichzeitig die Fähigkeit zur abermaligen Teilung, während der der Sekundärzelle klein und dicht wird (vgl. Abb. 5a und b) und anscheinend nicht mehr imstande ist, sich

zu teilen, denn nachträglich durchgeteilte Sekundärzellen wurden nie angetroffen. Daß sich zwischen Zellgröße und Kerngröße eine Art Gleichgewicht einstellt, geht auch aus Fällen wie den in Abb. 6 b, c dargestellten hervor: bei deutlich verschiedener Größe der Sekundärzellen ist die Kerngröße entsprechend dem Zellvolumen abgestuft. Weiters sind die Sekundärzellen und ihre Kerne in offensichtlich hochpolyploiden Epidermiszellen gewöhnlich größer als in niedrigpolyploiden, was sich allerdings nur bei kräftigen Unterschieden im Polyploidiegrad erkennen läßt.

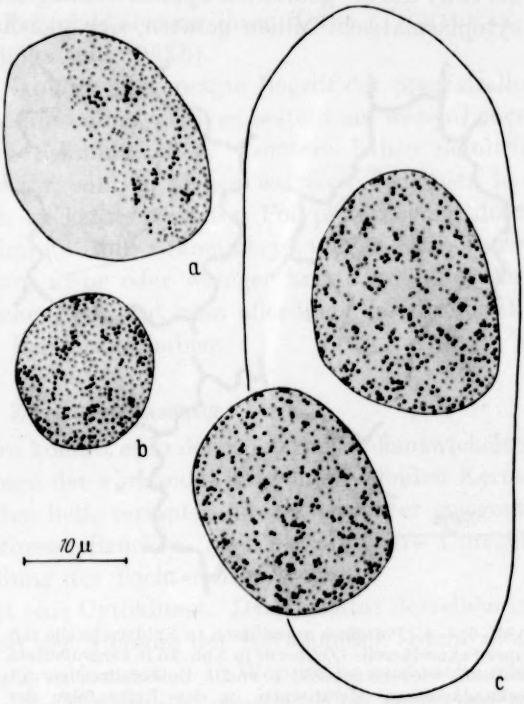


Abb. 5a—c. *Portulaca grandiflora*. a Großer locker gebauter Ruhekern einer Primärzelle; b Kleiner dichter Kern einer Sekundärzelle (beide stammen aus einer Epidermiszelle mit zwei Sekundärzellen); c Schwesterkerne knapp nach der Cytokinese, noch keine Unterschiede zeigend (die Membran der Sekundärzelle wurde im Bereich des Primärzellkernes weggelassen). Alkohol-Eisessig, Essigkarmin, Euparal

Wenn auch das kritische Stadium der Anaphase nicht ausreichend untersucht werden konnte, so ergibt sich aus den vorliegenden Tatsachen doch klar: es können nicht Unregelmäßigkeiten in der Verteilung der Chromosomen für das Zustandekommen der inäqualen Teilungen und der Kerngrößen-Unterschiede maßgebend sein — außer man nimmt einen sehr komplizierten Mechanismus an, durch den stets u dem nahe der Zellperipherie gelegenen Pol weniger und zu dem gegen das Zellinnere zu gelegenen Pol mehr Chromosomen befördert werden. Gegen eine solche Annahme spricht aber, daß in frühen Telophasen, bei denen sich die Chromosomenzahl abschätzen ließ, offenbar keine Unterschiede bestanden und bei späten Telophasen die Größe und der innere Bau der Tochterkerne sich übereinstimmend verhielt. Abgesehen von der einen eingangs erwähnten mittleren Telophase mit „stickiness-Brücken" fanden sich keinerlei Störungen in Form von nachhinkenden oder zurückbleibenden Chromosomen oder Chromosomenstücken, und auch mehrpolige

Teilungsfiguren wurden nicht beobachtet. Man gewinnt vielmehr den Eindruck, als ob, ähnlich wie im Pollenkorn der Angiospermen, ein cytoplasmatischer Gradient bestünde, der sich bei einer Einstellung der Teilungsspindel senkrecht oder leicht schräg zur Wand der Mutterzelle auswirkt, indem zwei ungleichartige Tochterzellen entstehen, während bei einer um 90° gedrehten Spindelstellung beide Tochterkerne ins gleiche cytoplasmatische Milieu geraten, sich gleichartig weiterentwickeln und den Ausgang für gleichwertige Zellen bilden (Geitler 1935).

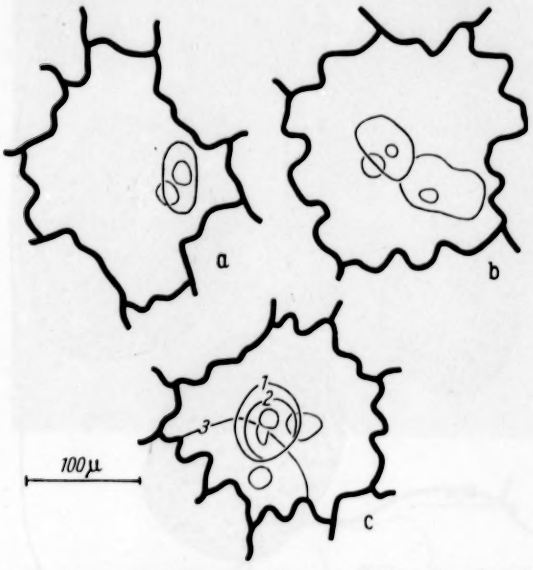


Abb. 6a—c. *Portulaca grandiflora*. a Epidermiszelle mit einer Sekundärzelle (Zellkerne in Abb. 5c in vergrößertem Maßstab wiedergegeben); b und c Epidermiszellen mit Sekundärzellen (Membranen in der Reihenfolge der Bildung gekennzeichnet), beachte bei b und c die Abstufung der Kerngröße nach dem Alter und der Größe der zugehörigen Zellen. Alkohol-Eisessig, Essigkarmin, Euparal

Außer diesem geläufigen Beispiel sind andere Fälle bekannt, in denen die verschiedene Form, Größe und weitere Entwicklung zweier Schwesterkerne offensichtlich durch einen Gradienten im Cytoplasma induziert wird. So bilden sich bei Vertretern der Gattung *Oedogonium* im Zuge der Teilung der streng polar gebauten Zellen zwei ungleich große Kerne (Tschermak-Woess 1943). Der größere, locker gebaute verbleibt in der Kappenzelle, der kleinere, dichter strukturierte Kern kommt in die Scheidenzelle zu liegen. — Eine unterschiedliche Entwicklung der Tochterkerne im Anschluß an eine inäquale Zellteilung erfolgt auch bei der Bildung der Schließzellenmutterzellen (= Spezialmutterzellen, Strasburger 1866) der Angiospermen. Bünning und Sagromsky dehnen den Begriff der Spezialmutterzelle auf ähnliche Initialzellbildungen aus und prägen den Ausdruck Spezialzelle. „Eine Spezialzelle ist eine plasmareiche Zelle, die von einer plasmaärmeren abgetrennt wird, indem sich das Plasma vor der Teilung der Zelle lokal anhäuft und die neue Wand diese Plasmaanhäufung von der übrigen Zelle abgrenzt." Meist ist die plasmareichere Zelle kleiner und die Teilungsfähigkeit ihres Zellkernes groß. Solche Zellen stellen Organisationszentren („Meristemoide") dar, die ihre Umgebung zur Bildung bestimmter Gewebe

und Organe anregen können. — Weiters kommt es auch bei der Bildung von Trichozyten, die durch eine inäquale Zellteilung der Trichocytenmutterzelle entstehen, zur ungleichartigen Weiterentwicklung der Schwesterzellen und ihrer Kerne (SINNOTT und BLOCH). Häufig verhalten sich die Trichozyten hinsichtlich ihrer Teilungsfreudigkeit unterschiedlich gegenüber den Atrichozyten, und bei manchen Arten kommt es zu einer mehr oder minder bedeutenden Polyploidisierung ihrer Kerne (TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA 1953a und 1953b).

Der von BÜNNING und SAGROMSKY geprägte Begriff der Spezialzelle läßt sich für *Portulaca* nicht anwenden, denn es besteht ein wesentlicher Unterschied gegenüber den Sekundärzellen. Letztere haben nämlich keinen embryonalen Charakter, sind zu keinen weiteren Teilungen befähigt und es kommt auch zu keiner weiteren Polyploidisierung ihrer Kerne. Ob ihnen eine bestimmte Rolle zukommt, ist unklar. Da sie erst in vollentwickelten Blättern, mehr oder weniger knapp vor dem Absterben der Pflanzen entstehen, gewinnt man allerdings den Eindruck, daß sie keine funktionelle Bedeutung haben.

Zusammenfassung

Bei *Portulaca grandiflora* kommt es in der Epidermis vollentwickelter Blätter zu spontanen Mitosen der vorhandenen endopolyploiden Kerne. Soweit sich bisher feststellen ließ, verlaufen diese zwar unter gelegentlicher Bildung von „stickiness"-Brücken, aber ohne gröbere Unregelmäßigkeiten in der Verteilung der Tochterchromosomen.

Jeder Kernteilung folgt eine Cytokinese. Das Resultat derselben ist offensichtlich abhängig von der Stellung der Kernspindel. Steht diese — was anscheinend häufiger vorkommt — in Wandnähe senkrecht oder schräg zu einer der Wände der Mutterzelle, dann wird im Zuge einer inäqualen Teilung an der Peripherie der Zelle eine kleine „Sekundärzelle" abgegliedert; steht sie nicht in Wandnähe parallel zu den Periklinen, so bilden sich gleichwertige Tochterzellen.

Die Sekundärzellen enthalten relativ mehr und vielleicht auch dichteres Cytoplasma als ihre großen Schwesterzellen (Primärzellen), was sich auf die Kerne auswirkt, indem diese in den Sekundärzellen klein und dicht werden, in der Primärzelle dagegen groß und locker gebaut bleiben. Nur die Primärzellen sind zu wiederholter Teilung befähigt; sie können bis zu 12 Sekundärzellen abgliedern.

Eine funktionelle Deutung dieser Vorgänge und ihres Endresultates läßt sich nicht geben.

Literatur

BÜNNING, E., u. H. SAGROMSKY: Die Bildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis. Z. Naturforsch. **3b**, 203—216 (1948). — CZEIKA, G.: Strukturveränderungen endopolyploider Ruhkerne im Zusammenhang mit wechselnder

Bündelung der Tochterchromosomen und karyologisch-anatomische Untersuchungen an Sukkulenten. Öst. bot. Z. **103**, 536—566 (1956). — Geitler, L.: Beobachtungen über die erste Teilung im Pollenkorn der Angiospermen. Planta (Berl.) **24**, 361—386 (1935). — Sinnott, W., and R. Bloch: Cell polarity and the differentiation of root hairs. Proc. nat. Acad. Sci. (N.Y.) **25**, 248—252 (1939). — Strasburger, E.: Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Spaltöffnungen. Jb. wiss. Bot. **5**, 297—342 (1866). — Tschermak, Elisabeth: Vergleichende und experimentelle cytologische Untersuchungen an der Gattung *Oedogonium*. Chromosoma (Berl.) **2**, 493—518 (1943). — Tschermak-Woess, Elisabeth, u. Gertrude Hasitschka: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. Chromosoma (Berl.) **5**, 574—614 (1953a). — Über Musterbildung in der Rhizodermis und Exodermis bei einigen Angiospermen und einer Polypodiacee. Öst. bot. Z. **100**, 648—651 (1953b).

Dr. G. Czeika,
Botanisches Institut der Universität, Wien 40 (Österreich), Rennweg 14

Planta, Bd. 51, S. 575—583 (1958)

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

IST DIE PFLANZLICHE PHOTOSYNTHESE EINE LICHTREAKTION MIT RÜCKLÄUFIGER DUNKELREAKTION?

EIN VERSUCH, MANOMETRISCHE LICHT-DUNKEL-KURVEN VON CHLORELLA ZU ERKLÄREN

Von

BOGISLAV RACKOW

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Februar 1958)

Die Hypothese von WARBURG[6], daß der Primärprozeß der Photosynthese eine Lichtreaktion mit einer teilweise rückwärts verlaufenden Dunkelreaktion darstellt, beruht auf der Beobachtung, daß in der manometrischen Apparatur unmittelbar nach Einschalten der Belichtung die Manometersäule ihre höchste Steigungsgeschwindigkeit besitzt und sich dann in den ersten Minuten logarithmisch bis auf einen konstanten Wert verlangsamt. Außerdem beruht sie darauf, daß nach Ausschalten des Lichtes ein rasches logarithmisches Absinken der Manometersäule bis zur Konstanz beobachtet wird (siehe obere Kurve in Abb. 1). Die eine Methode zu kontrollieren, ob diese Erscheinung sich im Sinne von WARBURGS Hypothese als O_2-Ausstoß deuten läßt, der in den nächsten Minuten zurückreagiert, besteht darin, den anfänglich ausgestoßenen Sauerstoff durch das Milieu chemisch abzufangen und dadurch die

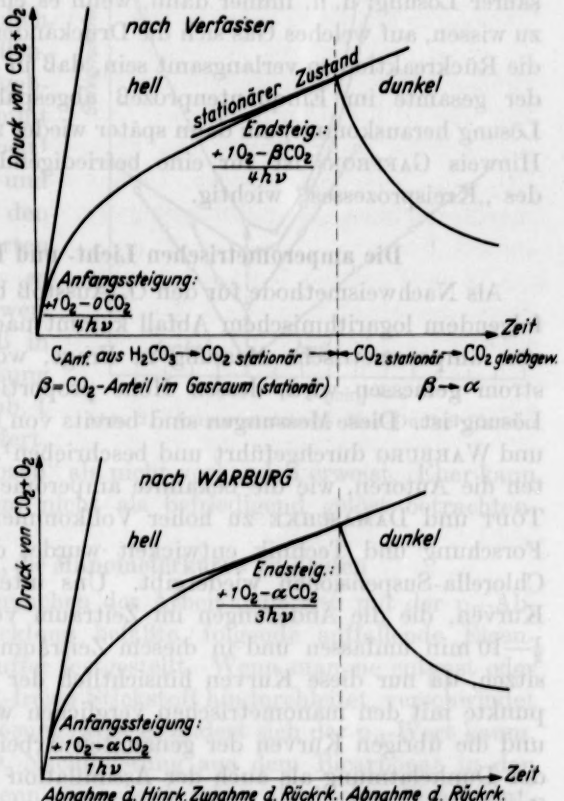


Abb. 1. Manometrische Hell-Dunkel-Kurven

Photosynthese zum Stillstand zu bringen. Dieses wurde in einer früheren Arbeit[4] von uns bereits durchgeführt, und wir erhielten das auch von anderen Autoren auf andere Weise gewonnene Ergebnis, daß diese hypothetische Rückreaktion nicht existiert.

Die andere Prüfungsmethode dieses angeblich rückreagierenden O_2-Ausstoßes besteht darin, daß untersucht wird, ob der O_2-Ausstoß für sich allein, d. h. ohne Gegenwart von CO_2 oder mit einer *nur* auf O_2 ansprechenden Meßmethode bei Belichtungsbeginn ebenfalls als ein starker Ausstoß gemessen wird, der dann logarithmisch auf den stationären Wert zurückgeht.

GAFFRON und ROSENBERG[2] schreiben dazu: „Nach WARBURG und BURK soll eine so schnelle (d. h. nicht mehr beobachtbare [der Verf.]) Rückreaktion nur in alkalischen Medien auftreten. In neutraler oder saurer Lösung, d. h. immer dann, wenn es einer Rechnung bedarf, um zu wissen, auf welches Gas sich die Druckänderung bezieht, soll dagegen die Rückreaktion so verlangsamt sein, daß in der ersten halben Minute der gesamte im Einquantenprozeß abgespaltene Sauerstoff aus der Lösung herauskommt, um dann später wieder zu verschwinden." Dieser Hinweis GAFFRONS ist für eine befriedigendere Deutungsmöglichkeit des „Kreisprozesses" wichtig.

Die amperometrischen Licht- und Dunkelkurven

Als Nachweismethode für den O_2-Ausstoß bei Belichtungsbeginn mit folgendem logarithmischem Abfall kommt nach meinem Ermessen nur eine amperometrische Messung in Frage, wobei der Depolarisationsstrom gemessen wird, dessen Höhe proportional dem O_2-Gehalt der Lösung ist. Diese Messungen sind bereits von DAMASCHKE, TÖDT, BURK und WARBURG durchgeführt und beschrieben[1]. In dieser Arbeit berichten die Autoren, wie die bekannte amperometrische Methode, die von TÖDT und DAMASCHKE zu hoher Vollkommenheit und Exaktheit für Forschung und Technik entwickelt wurde, die O_2-Veränderungen in Chlorella-Suspensionen wiedergibt. Uns interessieren hier diejenigen Kurven, die die Änderungen im Zeitraum von größenordnungsmäßig $\frac{1}{2}$—10 min umfassen und in diesem Zeitraum mehrere Meßpunkte besitzen, da nur diese Kurven hinsichtlich der Zeit und Zahl der Meßpunkte mit den manometrischen verglichen werden können. Da diese und die übrigen Kurven der genannten Arbeit[1] sowohl in der Periode der Dunkelatmung als auch der Assimilation während der stationären Zustände praktisch linear verlaufen, beweisen sie genauso wie die amperometrischen Kurven meiner Arbeit[3], daß der Strom dem stationären O_2-Umsatz proportional ist. Die vier in Frage kommenden Kurven der Arbeit[1] — es handelt sich um die beiden ersten Minima in Abb. 2 und Abb. 6 der genannten Arbeit — werden in Abb. 2 vorliegender

Arbeit zusammengestellt und aus Raumgründen übereinandergelegt, so daß der Beginn der Lichtperiode bei allen vier Kurven zeitlich zusammenfällt. Diese Kurven lassen die Konvexkrümmung entsprechend dem anfangs vorhandenen und darauf wieder verschwindenden Ausstoß des Einquanten-O_2 nicht einmal andeutungsweise erkennen*. Hiernach kann also eine Rückreaktion, die $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ so stark ist wie die Hinreaktion und in den ersten Minuten anläuft, nicht die Lichtreaktion begleiten. Bei den beiden oberen Kurven ist sogar eine entgegengesetzte Krümmung gefunden worden, d. h. die O_2-Abgabe erhöht sich mit der Zeit, was auf Effekte der Diffusionsträgheit hindeutet, die ja angeblich nicht vorhanden sein sollen.

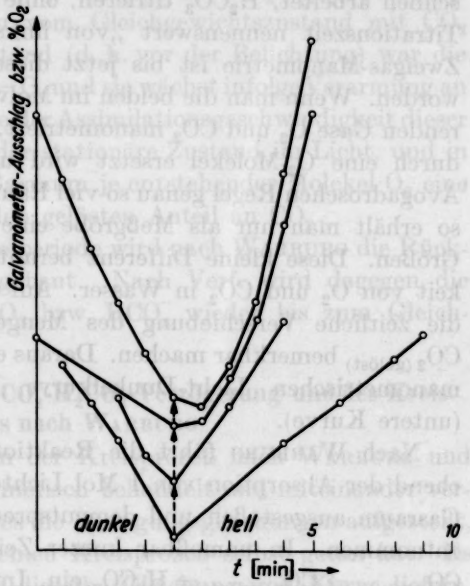


Abb. 2. Amperometrische Hell-Dunkel-Kurven

Da einerseits dieses Ergebnis, das zu beweisen bestimmt nicht der Zweck der Arbeit[1] war, durch unsere Arbeit[4] und die Arbeiten aller in den Arbeiten [4] und [2] zitierten Autoren bestätigt wird, so muß nunmehr untersucht werden, woran es liegt, daß in saurer und neutraler Lösung das Manometer die in Abb. 1 gezeichnete Kurve liefert, obwohl sich der „Kreisprozeß" als nicht vorhanden erweist. Eher kann man dieses ganze Problem nicht als befriedigend gelöst betrachten.

Ein Versuch, die Manometerkurve zu deuten

Wir haben bei den Versuchen der Arbeit[3], die sich mit der p_H-Abhängigkeit der O_2-Entwicklung befaßte, folgende auffallende Eigenschaften der Bicarbonatpuffer festgestellt. Wenn man sie entgast oder mehrere Minuten lang CO_2-freien Stickstoff hindurchleitet, verschwindet zwar der Sauerstoff der Lösung, aber es ändert sich der p_H-Wert kaum. Offenbar verläuft die CO_2-Nachlieferung aus dem Bicarbonat in den Gasstrom recht träge. Wenn ein an sich schon alkalisches Bicarbonat-Gemisch mit verdünnter Natronlauge noch alkalischer gemacht wird, stellt sich bei deren Zutropfen sofort ein neuer höherer p_H-Wert ein.

* Wie Herr Dr. K. Damaschke mir freundlicherweise mitteilte, zeigen auch die übrigen der zahlreichen von ihm gemessenen, in [1] nicht veröffentlichten Kurven nicht den anfänglichen „Einquanten-Sauerstoff" an.

Wird aber umgekehrt ein alkalisches Gemisch, über dem sich kein Gasraum befindet, durch Einleiten von CO_2-Gas saurer gemacht, so stellt sich erst nach mehreren Minuten ein fester niedriger p_H-Wert ein. Das liegt an der bekannten Tatsache, daß die erste der beiden Reaktionen

$$CO_{2\,(gelöst)} + H_2O \xrightarrow{langsam} H_2CO_3 \xrightarrow{schnell} H^+ + HCO_3^-$$

eine langsame Zeitreaktion ist. Bekanntlich kann man, wenn man sehr schnell arbeitet, H_2CO_3 titrieren, ohne daß dieses während der kurzen Titrationszeit nennenswert „von links" nachgeliefert wird. Bei der Zweigas-Manometrie ist bis jetzt diese Tatsache nicht berücksichtigt worden. Wenn man die beiden im Molverhältnis 1:1 gegenläufig reagierenden Gase O_2 und CO_2 manometriert, wobei laufend eine CO_2-Molekel durch eine O_2-Molekel ersetzt wird und eine Molekel CO_2 nach der Avogadroschen Regel genau so viel Raum wie eine O_2-Molekel einnimmt, so erhält man nur als Meßgröße eine kleine Differenz zweier großer Größen. Diese kleine Differenz beruht auf der verschiedenen Löslichkeit von O_2 und CO_2 in Wasser. Auf diese kleine Differenz muß sich die zeitliche Verschiebung des Mengenverhältnisses von H_2CO_3 zu $CO_{2\,(gelöst)}$ bemerkbar machen. Daraus ergibt sich eine neue Deutung der manometrischen Licht-Dunkelkurve WARBURGS, wie Abb. 1 zeigt (untere Kurve).

Nach WARBURG fährt die Reaktion folgendermaßen an: Entsprechend der Absorption von 1 Mol Lichtquanten wird ein Mol O_2 in den Gasraum ausgestoßen und dementsprechend 1 Mol CO_2 dem Gasraum entnommen. In unmeßbar kurzer Zeit stellt sich das Gleichgewicht $CO_{2\,(Gas)} \rightleftharpoons CO_{2\,(gelöst)} \rightleftharpoons H_2CO_3$ ein. Im Verlaufe von etwa 3 min bildet sich die Rückreaktion aus, bei der nach der Anlaufperiode $\frac{2}{3}$ des entwickelten O_2 wieder zurückgeholt und ebenso $\frac{2}{3}$ des entnommenen CO_2 wieder zurückgegeben wird, so daß nur noch das verbliebene $\frac{1}{3}$ Mol der Hinreaktion auf 1 Quant oder 1 Mol auf 3 Quanten stationär umgesetzt werden.

Unsere Deutung der Licht-Dunkelkurve berücksichtigt dagegen die H_2CO_3-CO_2-Verzögerung sowie die quantentheoretisch begründete Annahme, daß 1 Quant je 1 Oxydo-Reduktionsäquivalent umgesetzt wird, d. h. 4 Äquivalente je 1 CO_2 und 1 O_2. Zu Beginn der Lichtreaktion wird 1 O_2 je 4 oder mehr Lichtquanten ausgestoßen. Das bedeutet nur $\frac{1}{4}$ oder einen noch geringeren Bruchteil der von WARBURG angenommenen O_2-Entwicklung bei Belichtungsbeginn. Trotzdem ergibt sich bei Reaktionsbeginn dieselbe hohe Gasdruckzunahme wie bei WARBURGS Hypothese, weil kein CO_2 aus dem Gasraum nach unserer Auffassung verschwindet. Der C-Bedarf wird aus dem in der Lösung vorhandenen H_2CO_3 bzw. HCO_3^- entnommen. Daß die Chlorella im alkalischen Gebiet diese Substanzen assimiliert, ist u. a. auch vom Verf. in einer früheren Arbeit[3] bewiesen worden, als die O_2-Entwicklung im Warburg- und Emerson-Gemisch im alkalischen Gebiet gemessen wurde. Unmittelbar

vor Einschalten des Lichtes wurde 20 min lang reiner Stickstoff zwecks Austreibung von O_2 (und CO_2) aus der Lösung hindurchgeleitet. Das Ausschalten des Stickstoffstromes und Einschalten des Lichtes geschah gleichzeitig, und sofort setzte auch die Assimilation ein. Wenn nun die Algen H_2CO_3 oder HCO_3^- assimilieren, so verarmt die Lösung daran, und sie steht bezüglich dieser Substanzen nicht mehr im Gleichgewicht mit CO_2 im Gasraum und in Lösung. Nun setzt die Zeitreaktion $CO_2 \rightarrow H_2CO_3$ bzw. HCO_3^- ein, und zwar um so schneller, je weiter sich der H_2CO_3- bzw. HCO_3^--Gehalt infolge der Assimilation vom Gleichgewichtszustand mit CO_2 entfernt. Im Gleichgewichtszustand (d. h. vor der Belichtung) war die Nachlieferungsgeschwindigkeit = O, und sie wächst infolge Verarmung an H_2CO_3 bzw. HCO_3^- so lange, bis sie der Assimilationsgeschwindigkeit dieser Substanzen gleich ist. Das ist der stationäre Zustand im Licht, und in diesem verschwindet aus dem Gasraum je entstehender Molekel O_2 eine Molekel CO_2, vermindert um den gelösten Anteil an CO_2.

In der anschließenden Dunkelperiode wird nach WARBURG die Rückreaktion der Photoreaktion abgebaut. Nach Verf. wird dagegen die stationäre Verarmung an H_2CO_3 bzw. HCO_3^- wieder bis zum Gleichgewichtszustand aufgeholt.

Die kinetische Behandlung der CO_2-H_2CO_3-Verzögerung und des Kreisprozesses nach WARBURG

In diesem Abschnitt werden der Kreisprozeß nach WARBURG und die CO_2—H_2CO_3-Verzögerung kinetisch behandelt und miteinander verglichen, d. h. es werden für beides die Bewegungsgleichungen aufgestellt, was übrigens WARBURG[5] für seinen Kreisprozeß selbst getan hat. Es ergibt sich, daß beide Prozesse dieselbe Gleichung und Kurve liefern, wodurch bewiesen wird, daß die Kurve der Zweigasmanometrie zwischen beiden Auffassungen nicht entscheiden kann. Zunächst der Kreisprozeß nach WARBURG:

Es sei x_{O_2} = die durch die Lichtmenge I in der Zeit t entwickelte O_2-Menge
ε = der zurückreagierende Bruchteil ($= \frac{2}{3} - \frac{3}{4}$)
I = absorbierter Quantenstrom
φ = photochemische Ausbeute (Mol O_2 pro Mol Quanten)
k = Geschwindigkeitsfaktor der Rückreaktion,

dann ist die O_2-Entwicklungsgeschwindigkeit

$$\frac{dx_{O_2}}{dt} = I\varphi - \varepsilon I\varphi\,(1 - e^{-kt}). \tag{1}$$

Das bedeutet für den Beginn der Reaktion ($t = 0$, d. h. $e^{-kt} = 1$)

$$\frac{dx_{O_2}}{dt} = I\varphi \tag{2}$$

und für den stationären Zustand ($t = \infty$, d. h. $e^{-kt} = 0$)

$$\frac{dx_{O_2}}{dt} = I\varphi - \varepsilon I\varphi. \tag{3}$$

Der Faktor $1-e^{-kt}$ bewirkt die konvexe Krümmung der Anlaufperiode, die experimentell für O_2 allein sichergestellt werden muß. Soweit die von WARBURG gegebene Gleichung.

Nach unserer Auffassung gilt jedoch — und die amperometrischen Geraden bestätigen das — die lineare Beziehung

$$\frac{dx_{O_2}}{dt} = I\varphi = \text{const.} \tag{4}$$

Da wir aber keine Rückreaktion annehmen und die Quantenausbeute nicht 1 sondern $\frac{1}{4}$ sein soll, ist bei uns der erste rechte Summand der Gl. (1) $I\varphi$ durch Gleichsetzung mit Gl. (4) der O_2-Anteil. Der zweite Summand $-\varepsilon\, I\varphi(1-e^{-kt})$ bleibt dann notwendigerweise als der Anteil des gasförmigen CO_2 übrig. Wir wollen aber nunmehr α statt ε setzen, wobei α der in der Gasphase enthaltene Bruchteil des gesamten CO_2 ist. Die Gleichung lautet dann

$$\frac{dx_{(CO_2+O_2)gas}}{dt} = \frac{I\varphi - \alpha I(1-e^{-kt})}{(O_2)\ (CO_{2\,gas})} \tag{5}$$

$dx_{(CO_2+O_2)gas}$ wird hier deshalb geschrieben, weil WARBURG das Gasgemisch $CO_2 + O_2$ in der manometrischen Vorrichtung nicht getrennt gemessen, sondern unter Voraussetzung unendlich schneller Gleichgewichtseinstellung auseinandergerechnet hat.

Nunmehr wird bewiesen, daß es berechtigt ist, die Gl. (1) in Gl. (5) umzudeuten und umzuschreiben.

Wir nehmen an, daß die Pflanze H_2CO_3 bzw. HCO_3^- primär einbaut. Aus Gl. (5) ergibt sich für $t = 0$:

$$\frac{dx_{(CO_2+O_2)gas}}{dt} = \frac{dx_{O_2}}{dt} = I\varphi\,. \tag{6}$$

Das zweite Glied der G. (5), das CO_2-Glied, ist also verschwunden. Das bedeutet: Zu Beginn gelangt nur O_2 in den Gasraum, und zwar nur mit der Quantenausbeute $\frac{1}{4}$ und mehr; aber dafür verschwindet *kein* CO_2 aus dem Gasraum; denn wir setzen voraus, daß die Pflanze H_2CO_3 bzw. HCO_3^- chemisch einbaut, dessen chemische Nachlieferung aus $CO_{2\,(gelöst)}$ Zeit braucht. Dadurch wird das Verhältnis CO_2/H_2CO_3 aus dem Gleichgewicht gebracht, und der zeitliche Umsatz der Reaktion $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$ wird immer größer, je größer der Abstand vom Gleichgewichtszustand wird, bis ein stationärer Zustand erreicht ist, in dem der Verbrauch von H_2CO_3 bzw. HCO_3^- gleich der Nachlieferung desselben aus CO_2+H_2O ist. Im Gasraum gilt im stationären Zustand $(t = \infty)$:

für CO_2:
$$\frac{dx_{CO_2}}{dt} = \alpha I\varphi\,. \tag{7}$$

für $CO_2 + O_2$:
$$\frac{dx_{(CO_2+O_2)gas}}{dt} = \frac{I\varphi - \alpha I\varphi}{(O_2)\ \ (CO_{2\,gas})}\,. \tag{7a}$$

Würde demnach das gesamte CO_2, das mit der Geschwindigkeit $I\varphi$ verbraucht wird, dem Gasraum entnommen, so würde die Änderung der Molzahl im Gasraum O sein und deshalb würde man wegen der Avogadroschen Regel keine Druckänderung messen können. Da aber der CO_2-Anteil im Gasraum nur α und in der Flüssigkeit dementsprechend $1-\alpha$ beträgt, so ist auch die Geschwindigkeit, mit der CO_2 aus dem Gasraum verschwindet, $\alpha I\varphi$.

Das Verschwinden des CO_2 aus dem Gasraum geschieht um so schneller, d. h. die Beschleunigung der Reaktion $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$ ist um so größer, je weiter die Reaktionsgeschwindigkeit noch von der des stationären Zustandes $\alpha I\varphi$ entfernt ist, bei dem die Beschleunigung O ist und die Verbrauchs- und Nachlieferungsgeschwindigkeit gleich sind. Dieser in Worten ausgedrückte Sachverhalt wird, da die Beschleunigung (2. Ableitung nach der Zeit) proportional der Differenz zwischen der stationären CO_2-Geschwindigkeit $\alpha I\varphi$ und der vor Erreichen derselben vorhandenen CO_2-Geschwindigkeit ist, durch folgende Gleichung wiedergegeben:

$$\frac{d^2x_{CO_2\,gas}}{dt^2} = k\left(\alpha I\varphi - \frac{dx_{CO_2\,gas}}{dt}\right). \tag{8}$$

Die erste Integration von Gl. (8) liefert

$$\frac{dx_{CO_2\,gas}}{dt} = \alpha I\varphi\,(1-e^{-kt}). \tag{9}$$

Die Summierung von Gl. (9) und Gl. (6) bzw. G. (9) und Gl. (4) ergibt Gl. (5), womit deren Voraussetzung und Berechtigung erwiesen ist, an Stelle von Gl. (1) zu treten.

Entgegnung auf Einwände gegen diese Arbeit

1. Warburgs Hinweis, der „Kreisprozeß" sei nicht auf Verzögerungseffekte zurückzuführen, weil die Messungen von der Schüttelgeschwindigkeit unabhängig seien, trifft nicht für die CO_2-H_2CO_3-Verzögerung zu. Eine in homogener Lösung ablaufende Zeitreaktion wie diese oder auch die Verseifung eines Esters ist von der Rührgeschwindigkeit unabhängig und nicht durch Bewegung der Flüssigkeit zu beeinflussen. Also ist die Unabhängigkeit der Meßergebnisse von der Flüssigkeitsbewegung kein Gegenbeweis gegen das Vorhandensein einer milieubedingten Verzögerung.

2. Auch folgender Einwand, der ebenso wie die nachstehenden bei der Abfassung der Arbeit von berufener Seite erhoben wurde, hat sich als nicht stichhaltig erwiesen. Er ging davon aus, daß im sauren Gebiet der prozentige Anteil an H_2CO_3 bzw. HCO_3^- gegenüber CO_2 derart gering sei, daß er nicht ins Gewicht falle. Daß dieser Einwand unberechtigt ist, zeigt folgende Rechnung:

Im Falle eines sauren Milieus wird angegeben, daß sich bei 15° und 1 Atm. CO_2-Druck in 1 Raumteil Wasser 1 Raumteil CO_2 löst. Von diesem $CO_{2\,(gelöst)}$ wird angegeben, daß sich ein bestimmter Teil in $H_2CO_{3\,(undissoziiert)}$ bzw. HCO_3^- und H^+ in einer Zeitreaktion verwandelt, wodurch ja bekanntlich die Lösung sauer reagiert. Dieser schwer meßbare Anteil von chemisch gebundener Kohlensäure liegt zwischen 1% und 1‰ von $CO_{2\,(gelöst)}$. Also setzen wir ihn mit rund 5‰ an. Im Manometergefäß mögen sich 10 cm^3 H_2O befinden, darüber CO_2 bei normalem Luftdruck, und die aufgesetzte Barometercapillare habe einen Innendurchmesser von $\frac{1}{2}$ mm, was einem Capillarquerschnitt von etwa $\frac{1}{5}$ mm^2 (genauer 0,196) entspräche. Wenn man also 5‰ H_2CO_3 verschwinden und wieder nachentstehen ließe, was einem verschwindenden und wiederentstehenden Volumen von 50 mm^3 CO_2 im Gasraum entspräche, so macht dieser Prozeß, isotherm und isobar gemessen, etwa $\frac{1}{4}$ m Steighöhe bzw. Meniskusverschiebung (genauer 25,5 cm) in der genannten Capillare aus. Das ist ein unerwartet großer Effekt. Selbst ein relativ kleiner Teileffekt dieses genannten Effektes liegt immer noch innerhalb der zu betrachtenden Größenordnung. Auch die Geschwindigkeitsrate dieser Reaktion liegt in der richtigen Größenordnung von einer halben bis zu einigen Minuten.

3. Es wurde eingewendet, daß die Organismen die Einstellung des CO_2-H_2CO_3-Gleichgewichtes mittels Carboanhydrase unmeßbar schnell vornehmen und dieses Ferment gehe auch in das Milieu einer Chlorella-Suspension über. Auch dieser Einwand ist nicht zutreffend. Die Carboanhydrase ist ein gut erforschtes Ferment, von dem folgendes bekannt ist. Alle Lebewesen, die angewiesen sind, CO_2 in die Luft auszuatmen (Tiere, Landpflanzen) oder CO_2 aus der Luft zu assimilieren (Landpflanzen), bedürfen dieses Fermentes und besitzen es auch. Organismen aber, die H_2CO_3 durch die Zellwand mit dem wäßrigen Milieu austauschen (Wasserpflanzen), benötigen dieses Ferment nicht und besitzen daher praktisch keine Carboanhydrase-Aktivität. Ferner ist dieses Ferment, da es ja zur Stabilisierung höherer p_H-Werte dient, im Sauren überflüssig und unterhalb p_H 6 praktisch inaktiv, und das ist ja gerade der interessierende p_H-Bereich, in dem die beiden Gase hauptsächlich gasförmig vorliegen und die Manometer die typische Hell-Dunkelkurve zeigen. Deshalb ist es zwecklos, diese Chlorella-Versuche in Gegenwart von Carboanhydrase zu wiederholen und nachzuprüfen, ob sich auch dann noch die „Rückreaktion" einstellt.

4. Ferner wurde eingewendet, die Pflanze assimiliere zwar im Alkalischen den Kohlenstoff auf dem Wege über H_2CO_3 bzw. HCO_3^-, aber im Sauren assimiliere sie ihn direkt als CO_2, so daß damit die CO_2-H_2CO_3-Verzögerung überhaupt nicht zur Auswirkung käme und meine ganze kinetische Betrachtung dadurch wertlos und überflüssig sei. Mir ist

zwar kein Experiment bekannt, wodurch bei der Pflanze bewiesen ist, daß die H_2CO_3-HCO_3^--Stufe bei der Assimilation umgangen wird. Man diskutiert vielmehr heute als Primär-Addukt einen Kohlensäure-Enol-Ester, der dann zur Carboxylverbindung umgelagert wird. Wenn aber dennoch die Pflanze im Sauren CO_2 direkt assimilieren sollte, so ist damit noch nicht gesagt, daß die Pflanze den anderen, im Alkalischen benutzten Weg über H_2CO_3 bzw. HCO_3^- im Sauren *vollständig* abgeschaltet hat, obwohl ihr diese Substanzen auch im Sauren noch angeboten werden. Es ist vielmehr durch nichts bewiesen und unwahrscheinlich, daß die Alge H_2CO_3 bzw. HCO_3^- im Sauren überhaupt nicht mehr aufnimmt, sondern ausschließlich auf CO_2 umgeschaltet hat. Es müßte dann beim allmählichen Übergang vom Alkalischen in das Saure eine plötzliche 100%ige Umschaltung vom Bicarbonat- auf den Kohlendioxydverbrauch stattfinden. Davon kann keine Rede sein. Selbst wenn die Pflanze 96% des Kohlenstoffes direkt aus CO_2 und nur 4% auf dem Wege über H_2CO_3 bzw. HCO_3^- im Sauren aufnimmt, so macht das im beschriebenen Rechenbeispiel immer noch einen Manometereffekt von 1 cm Steighöhe aus und ist daher gut meßbar. Manometrische Effekte dieser Größenordnung sind also auf alle Fälle zu erwarten und geben keinen Anlaß, auf einen „Kreisprozeß der Photosynthese" zu schließen.

Zusammenfassung

Es wird gezeigt, daß mit Hilfe einer quantitativen O_2-Bestimmungsmethode bei Belichtungsbeginn einer Chlorella-Suspension kein „Einquanten-Sauerstoff" gefunden wird, wie er aus Manometer-Versuchen von Warburg erschlossen wurde.

Dann wird nachgewiesen, daß die in den Manometergefäßen sich abspielende Zeitreaktion $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$ den „Kreisprozeß der Photosynthese" vortäuschen kann, ja sogar vortäuschen muß.

Literatur

[1] Damaschke, K., F. Tödt, D. Burk u. O. Warburg: Biochim. biophys. Acta **12**, 347 (1953). — [2] Gaffron, H., u. J. Rosenberg: Naturwissenschaften **42**, 354 (1955). — [3] Rackow, B.: Planta (Berl.) **49**, 489 (1957). — [4] Rackow, B.: Planta (Berl.) **49**, 494 (1957). — [5] Warburg, O.: Z. Elektrochem. **55**, 447 (1951). — [6] Warburg, O.: Naturwissenschaften **39**, 337 (1952).

Dr. Bogislav Rackow, Jena, Stumpfenburgweg 2

Planta, Bd. 51, S. 584—599 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien
und der Biologischen Station Lunz

SELEKTIVE PAARUNG UND GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG DER KOPULATIONSPARTNER BEI DER DIATOMEE COCCONEIS

Von
LOTHAR GEITLER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Februar 1958)

Einleitung

Die sexuelle Fortpflanzung der pennaten Diatomeen erfolgt in der Weise, daß sich Gametenmutterzellen paaren, daraufhin jeder Partner unter Ablauf der Meiose zwei Gameten oder einen Gameten bildet und schließlich die Gameten mittels eines Kopulationsschlauchs oder in mehr amorpher Gallerte fusionieren. Doch bestehen gerade bei den pennaten Diatomeen aus ihrer besonderen Organisation sich ergebende Probleme hinsichtlich der Ausprägung der Geschlechtsmerkmale und der Art der Geschlechtsbestimmung, wenn man auf dem Boden einer allgemeinen Sexualitätstheorie im Sinne MAX HARTMANNs steht (zuletzt 1956); denn es erfolgt in allen Fällen anscheinend morphologische Isogamie und die Kriterien sind schwankend, was als bewegungsphysiologische Anisogamie oder in Einzelfällen vielleicht doch als morphologische Anisogamie angesehen werden kann (vgl. meine zusammenfassende Darstellung 1957).

Wenn zwei Gameten je Mutterzelle gebildet werden, ist es nicht ohne weiters klar, ob die sich paarenden Mutterzellen oder die kopulierenden Gameten sexuell determiniert sind (ähnlich liegt die Problematik im Fall der Ciliaten; vgl. HARTMANN). Für die Deutung, daß die Mutterzellen Zwitter und die Gameten einer Mutterzelle verschieden geschlechtlich sind, muß außer Selbststerilität angenommen werden, daß der männliche Gamet des einen Partners „richtig" in bezug auf den weiblichen des anderen zu liegen kommt, d. h. die Gameten „einverständlich" umgelagert werden, oder daß die Geschlechtsbestimmung nach ihrer Umlagerung in gegenseitiger Abhängigkeit erfolgt. Die Auffassung der Verschiedengeschlechtlichkeit der Gameten einer Mutterzelle bei Allogamie läßt sich trotz diesen gedanklichen Schwierigkeiten nicht ohne weiters ablehnen, da Gegenargumente bestehen (GEITLER 1932, S. 63ff. 205ff., 1956, S. 370).

Die Annahme einer derartigen gegenseitigen Beeinflussung ist rein spekulativ, da derzeit eine entsprechende stoffliche Grundlage, wie sie im Fall der begeißelten Gameten oder der Gametangien der Pilze gegeben ist, unbekannt ist. Eine solche wechselseitige Wirkung ginge wohl auch über die bei jedem Befruchtungsakt selbstverständliche Wirkung der Gameten oder Gametangien aufeinander hinaus (vgl. dazu das Schema, das KÖHLER für die bei einer Befruchtung ablaufende Reaktionskette gibt). Doch liegen konkrete Befunde über ein „einverständliches" Verhalten der Partner bei Diatomeen vor. So erfolgt bei *Epithemia zebra* var. *saxonica* die — in diesem Fall konstitutionell unvollkommene — Umlagerung der beiden Gameten eines Partners derart, daß in bezug auf den anderen zwei verschiedene, ohne Annahme einer gegenseitigen Beeinflussung gleich wahrscheinliche Stellungen möglich sind. Wie die Auszählung von 100 Paaren ergab, besteht aber ein Verhältnis von 78:22, also von ungefähr 4:1 (GEITLER 1932, S. 161). Da eine mechanische Verursachung ausgeschlossen ist und auch analoge Beziehungen zum Membranbau, wie sie weiter unten geschildert werden, nicht bestehen, muß es sich um ein reizphysiologisches Phänomen handeln[1].

Nicht um eine einverständliche Umlagerung je zweier Gameten in einem Paar, sondern um die gleich- oder gegensinnige Lage der Polaritätsachse, die bestimmt, in welcher Richtung der I. Richtungskörper abgeschnürt wird, handelt es sich in dem hier geschilderten Fall von *Cocconeis*. Die bisher untersuchten Arten *pediculus* und *placentula* sowie ihre zahlreichen Varietäten — die besser als Kleinarten zu bezeichnen wären — bilden je Mutterzelle nur einen Gameten. Nach der I. meiotischen Telophase erfolgt eine extrem inäquale, differentielle Cytokinese, die einen großen, zum Gameten sich entwickelnden Tochterprotoplasten und einen winzigen „Richtungskörper" ergibt (GEITLER 1927, 1932, 1948). Die inäquale Cytokinese verläuft entsprechend dem dorsiventralen Bau der *Cocconeis*-Zelle in gesetzmäßiger Weise ausgerichtet. Jede Zelle besitzt eine raphelose obere Schale und eine untere Rapheschale; mit dieser erfolgt die Anheftung an ein Substrat, der oberen Schale liegt der Chromatophor an. Beide Schalen können einer Epitheka (übergreifende Membranhälfte) oder einer Hypotheka (übergriffene Membranhälfte) angehören[2].

[1] Ähnlich könnte sich *Synedra ulna* verhalten, doch konnte hier keine statistische Prüfung vorgenommen werden.

[2] Außerdem besitzt der Protoplast noch eine transversale Asymmetrie — Kern in einem seitlichen Ausschnitt des Chromatophors und hufeisenförmig mit an der konvexen Seite exzentrisch gelagerten Nukleolus —, die aber für die folgenden Erörterungen keine Rolle spielt.

Beobachtungen

Paarungsfähig sind bei den bisher untersuchten Sippen von *Cocconeis pediculus* und *placentula* ausnahmslos nur Zellen, deren raphelose (obere) Schale als Epitheka, also die Rapheschale als Hypotheka ausgebildet ist (GEITLER 1952)[1]. Paare, deren einer Partner oder deren beide Partner als Rapheschale eine Epitheka besäßen, kommen nicht vor, es ist also die Hälfte der Zellen einer Population paarungsunfähig und $^3/_4$ der theoretisch möglichen Paarungskombinationen fallen aus. Mit dieser Eigentümlichkeit ist die Gesetzmäßigkeit verbunden, daß der Richtungskörper — im folgenden mit RK abgekürzt — ausnahmslos an der Hypo-

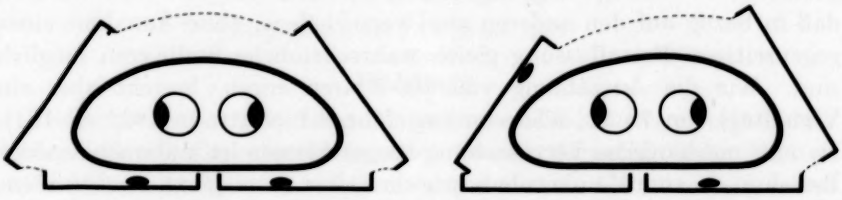


Abb. 1a u. b. Schema eines mittelspäten Kopulationsstadiums bei isogamen Sippen von *Cocconeis:* a beide Partner mit oberen Epitheken (obligatorisch bei *pediculus, placentula*-Sippen, bei var. *euglyptoides* gelegentlich); b ein Partner mit oberer, der andere mit unterer Epitheka (nur bei var. *euglyptoides*), wodurch Anisogamie vorgetäuscht wird; an den Hypotheken die Richtungskörper, im fusionierten Protoplasten die noch unverschmolzenen Gametenkerne mit ihren voneinander abgekehrten, exzentrischen Nukleolen

theka, das ist die Rapheschale, also in bezug auf die Unterlage nach unten abgegliedert wird. Die Voraussetzung dazu ist dadurch gegeben, daß die Längsachse der Spindel der I. meiotischen Teilung ± senkrecht auf die Schalenebenen orientiert ist. Die Tochterplatte, die „unten" liegt, wird nicht rekonstruiert und bleibt samt einem minimalen Plasmarest als pyknotischer Klumpen an die untere Schale angepreßt liegen (Abb. 1a). In dieser Weise verhalten sich *Cocconeis pediculus* und von *C. placentula* die Varietäten *klinoraphis*, *pseudolineata*, *tenuistriata*, *euglypta* fa. und auch die diploid parthenogenetische *lineata*, die eine Pseudomeiose durchmacht. Die früheren Angaben wurden neuerdings an einem noch größeren Material nachgeprüft und bestätigt. Für die Varietäten, bei denen die Kombination: raphelose Schale epithekisch, Rapheschale hypothekisch als notwendige Voraussetzung der Sexualisierung nicht unmittelbar beobachtet wurde, ergibt sich die Beziehung aus der Tatsache, daß der RK ebenfalls ausnahmslos nach unten gebildet wird. Das Verhalten ist, wie die Untersuchung von Tausenden von Paaren ergibt, völlig konstant — über eine wahrscheinlich nur scheinbare Ausnahme vgl. weiter unten — und bleibt sich bei den konstitutionell

[1] Auf S. 412, Z. 5, findet sich ein sinnstörender Druckfehler: statt „Rapheschale" muß es „raphelose Schale" heißen.

isogamen, anisogamen und parthenogenetischen Sippen gleich. Es ist also die pervalvare Polarität der sexualisierten Zellen — Abort des an die Hypotheka gelangenden Tochterprotoplasten — streng fixiert; ebenso schien bisher die Ausbildung der Rapheschale als Hypotheka unerläßlich[1].

Um so unerwarteter ist das Verhalten einer bisher nicht untersuchten Sippe von *placentula*, die als var. *euglyptoides* bezeichnet sei (Abb. 2)[2]. Bei ihr wird der RK in einem Paar meist vom einen Partner nach unten,

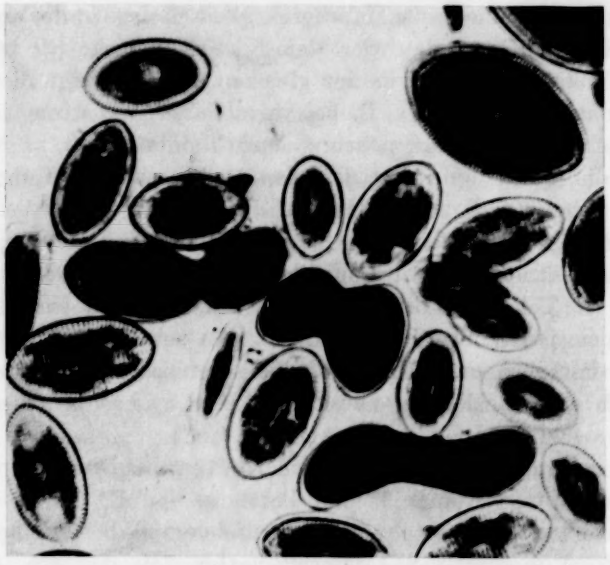


Abb. 2. Teil eines Aufwuchses auf einem Objektträger mit drei Kopulationspaaren von *Cocconeis placentula* var. *euglyptoides*, das rechte untere Paar mit Distanzpaarung, die Kopulationsgallerte stark gefärbt; außer vegetativen *euglyptoides*-Zellen sind noch Zellen von var. *pseudolineata* (am linken Rand) und var. *klinoraphis* (rechts oben) sichtbar. — Subl.-Alk., Fe-Alaun-Hämat., Kanadabalsam; Photo etwa 1150fach

vom andern nach oben gebildet (Abb. 1 b, 3, 5). Dieses Verhalten läßt sich außerdem nur bei var. *pseudolineata*, die mit *euglyptoides* nächst verwandt ist, beobachten, und zwar als sehr seltene Ausnahme — unter Tausenden in 5 Fällen. Es sind aber deutliche Anzeichen dafür vorhanden, daß es sich in diesen Fällen gar nicht um echte *pseudolineata*, sondern um Bastarde zwischen ihr und *euglyptoides* handelt (Näheres in der angekündigten Mitteilung).

Die var. *euglyptoides* trat im Aufwuchs auf Objektträgern auf, die im Seebach nächst der Biologischen Station Lunz (Niederösterreich)

[1] Eine analoge konstante Beziehung zwischen inäqualer Teilung und dem Membranbau besteht bei *Eunotia* (vgl. die „Besprechung").

[2] Ihre Beschreibung wird im Zusammenhang mit der Behandlung des gesamten polymorphen Formenkreises an anderer Stelle erfolgen (Geitler 1958).

ausgelegt worden waren (vgl. GEITLER 1927)[1]. Auf manchen Objektträgern erfolgten Massenkopulationen mit reichlicher Auxosporenbildung. Wie bei den anderen Varietäten handelt es sich nicht bloß um einen bestimmten Biotypus, sondern um eine genotypisch fixierte höhere systematische Einheit, die ihrerseits aus verschiedenen Biotypen oder Klonen zusammengesetzt ist. Klone lassen sich in den Populationen auf den Objektträgern unmittelbar an der Umrißform der Schalen und an der Schalenzeichnung erkennen. Innerhalb der untersuchten Populationen herrscht in dieser Hinsicht eine große Mannigfaltigkeit (Belege in der angekündigten Mitteilung). Der Ablauf der Meiose ist der gleiche wie bei anderen Sippen von *Cocconeis* und in der gleichen Weise erfolgt die Paarung. Die Kopulation läuft, wie z. B. bei var. *klinoraphis*, streng isogam ab. Nicht selten erfolgt Distanzpaarung- und kopulation, d. h. die Partner treten in die Meiose ein, ohne daß sie sich bis zur Berührung einander genähert haben (Abb. 2, rechts); dabei wird ein entsprechend langer Kopulationsschlauch gebildet (Abb. 4). Wie auch sonst beginnen oft nicht beide Partner gleichzeitig mit der Meiose; so kann der eine Partner schon die II. Telophase durchlaufen haben, während sich der andere noch in meiotischer Prophase befindet. An solchen Paaren läßt sich, wenn die Partner verschiedene Thekenkombinationen besitzen, überprüfen, ob eine Beziehung zwischen dieser und dem Altersstadium besteht.

Unter zahlreichen Kopulationen in verschiedenen Altersstadien wurden 844 notiert, die in beiden Partnern den RK erkennen ließen (aus optischen und färbetechnischen Gründen sind die RK nicht immer erkennbar). Von diesen 844 Paaren hatten 749 den RK des einen Partners nach unten, den des anderen nach oben gebildet und in 95 Paaren lagen beide RK unten; Paare mit beiden RK nach oben kommen nicht vor. Das Verhältnis beträgt also etwa 8:1 (genau 7,88:1). Eine andere Auszählung ergab 268:39 oder ungefähr 7:1. In Wirklichkeit dürfte das Verhältnis noch zugunsten der Paare mit „unten-oben-Lage" verschoben sein, denn von den nicht mitgezählten Paaren, in denen nur ein unterer RK erkennbar war, hatten vermutlich die meisten den anderen RK oben. Da der obenliegende RK von der aufklappenden Schale emporgehoben wird und von da an freiliegt (Abb. 1b, 3b), wird er bei der färberischen Differenzierung schneller gebleicht und dadurch unsichtbar; vielleicht wird er auch im Leben schneller zersetzt (der Kopulationsvorgang erstreckt sich über mehrere Tage). Allerdings läßt sich, wenn auch viel seltener, auch der umgekehrte Fall beobachten, d. h. man findet Paare, in denen nur ein obenliegender RK sichtbar ist und es können

[1] Die Fixierung erfolgte in SCHAUDINNS Sublimat-Alkohol, gefärbt wurde mit Eisenalaunhämatoxylin unter HCl-Differenzierung, eingeschlossen in Canadabalsam.

dann keine färbungstechnischen Gründe maßgebend sein. Für diese Fälle muß angenommen werden, daß entweder eine vorzeitige Zersetzung — eventuell wegen unterbliebener Verklumpung — stattgefunden hat, oder daß ausnahmsweise die Cytokinese unterblieben ist und der RK, wie regelmäßig der Tochterkern der II. meiotischen Telophase, im Mutterprotoplasten resorbiert wurde. Da der Beobachtung auch bei Verwendung reichlichen Materials große cytologisch-technische Schwierigkeiten entgegenstehen, läßt sich die Alternative meist nicht sicher entscheiden. Doch wurden einzelne Fälle gesehen, die für den Ausfall der Cytokinese sprechen. Das gleiche könnte sich auch ereignen, wenn der RK nach oben gebildet werden sollte. Das gefundene Zahlenverhältnis wird dadurch etwas ungenau.

Die Erklärung dafür, daß überhaupt der RK nach oben abgegliedert wird, liegt darin, daß die betreffenden Partner nicht die bei den anderen Sippen gesetzmäßig auftretende Kombination der Theken besitzen, sondern umgekehrt die Raphenschale epi- statt hypothekisch ist, also die Hypotheka oben liegt. Die Lagebeziehung zwischen RK und Hypotheka besteht also auch hier. Für sämtliche *Cocconeis*-Sippen gilt somit die Gesetzmäßigkeit, daß die bei der Meiose in Erscheinung tretende Polaritätsachse immer derart gerichtet ist, daß die gehemmte Tochterzelle im Anschluß an die Hypotheka entsteht. Von vornherein ließe es sich auch vorstellen, daß die Polaritätsachse bei *euglyptoides* um 180° gedreht ist. Die Annahme läßt sich durch die Beobachtung ausschließen.

Die unmittelbare Beobachtung des Membranbaus ist aber nicht leicht. Das Übereinandergreifen der Gürtelbänder ist bei *Cocconeis* infolge ihres gerundeten Schalenumrisses auch bei anderen, großzelligeren Varietäten schwer zu sehen. Eine sichere Feststellung gelingt meist nur in den frühen Stadien des Aufklappens der Theken (Geitler 1952). Bei *euglyptoides* ist die Kleinzelligkeit ein weiteres Hindernis, und außerdem stehen in dem untersuchten Material fast nur Zellen in Schalenansicht zur Verfügung. Zufällig in genauer Gürtelansicht liegende Partner sind sehr selten und müssen sich außerdem in einem ganz bestimmten Kopulationsstadium befinden. Es gelang nur in vier Fällen, geeignete Gürtelansichten zu beobachten. Von diesen Partnern befanden sich zwei noch vor der Bildung des RKs, die beiden anderen hatten den RK zur Rapheschale hin gebildet, die erwartungsgemäß der Hypotheka angehörte. Es mußte also ein Mittel gefunden werden, die beiden Fälle — Hypotheka oben oder unten — auch in Schalenansicht unterscheiden zu können[1]. Die Unterscheidung gelingt, bei entsprechender Übung, durch die Beobachtung des Lichtsaums, den der Rand bzw. Mantel der

[1] Es ist nicht zu erwarten, daß sich die Varietät als Epiphyt z. B. auf einer Fadenalge in Kopulation auffinden lassen wird, in welchem Fall Gürtelansichten leicht zu beobachten wären.

unteren Schale in Kombination mit dem Rand der oberen Schale bzw. der Randverdickung des Schalenmantels bildet. Wenn die obere Theke die Epitheka ist, also relativ weit ausladet, ist der Lichtsaum schmal und überstrahlt nur wenig die Randzeichnung der unteren Schale; im umgekehrten Fall ist die Randzeichnung eingeengt und der Lichtsaum verhältnismäßig breit (Abb. 3a). Obwohl es sich nur um Unterschiede von etwa $^1/_{10}\,\mu$ handelt, sind sie auf Grund des optischen Prinzips der vergrößernden Zerstreuungskreise und der Lichtbrechungsunterschiede

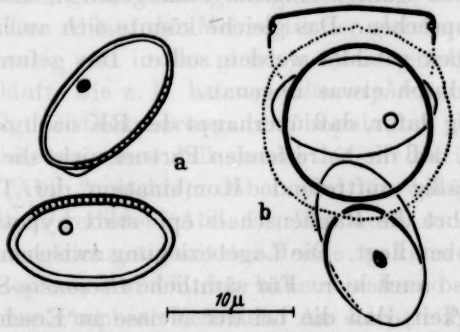


Abb. 3a u. b. Var. *euglyploides*. a Ein Kopulationspaar unmittelbar nach der Meiose, im Bild oben der Partner mit „oberer" Hypotheka, an ihr der Richtungskörper, im Bild unten der Partner mit „unterer" Hypotheka, an ihr der Richtungskörper; Randzeichnung bei Einstellung im Mikroskop auf den Rand der Rapheschalen. b Kugelige Zygote trotz isogamer Kopulation an der Stelle des Partners mit hypothekischer Rapheschale liegend; Flächenprojektion: zu unterst im Raum die hypo- und epithekische Raphenschale (an ersterer der Richtungskörper) in fast rechtwinkeliger Kopulationsstellung; in einer höheren Ebene die raphelosen Schalen, die epithekische senkrecht aufgeklappt, daher im optischen Schnitt, die hypothekische schräg gestellt, an ihr der Richtungskörper; zu höchst die Zygote mit geschrumpfter Gallerthülle. — Subl.-Alk., Fe-Alaun-Hämat., Kanadabalsam

in Canadabalsam dennoch erkennbar. Voraussetzung ist, daß die Zellen genau horizontal liegen. Außerdem dürfen die Theken noch nicht merklich klaffen, da sie dabei an den einander zugekehrten Enden sich aufheben und sich dadurch schrägstellen; die Epitheka kann sich auch seitlich verschieben. Daher gelingt die Beobachtung nicht an jedem Kopulationspaar. Die Brauchbarkeit der Methode wurde aber an der großzelligeren var. *klinoraphis* überprüft. Jedenfalls stimmt in fast allen Fällen die aus der Beobachtung erschlossene Thekenkombination mit der zu erwartenden Lage des RK überein.

Außerdem besteht noch eine zweite Möglichkeit der Überprüfung. Durch die Gallertentwicklung, welche das Aufklappen der Theken bewirkt, und bei der weiteren Gallertproduktion während der Gametenfusion wird auf die oberen Theken beider Partner ein Druck ausgeübt, der nicht nur nach oben, sondern auch seitlich und zentrifugal wirkt. Bei anderen isogamen Sippen, so z. B. bei *klinoraphis*, werden die beiden oberen Theken, da als Epitheken entwickelt, leicht über den Rand und

Gürtel der unteren Theka überschoben, so daß charakteristische symmetrische Bilder entstehen (Abb. 1a, vgl. auch 1948, Abb. 2g, 1952, Abb. 1c; die Erscheinung wurde damals nicht beachtet und in ihrer Bedeutung noch nicht erkannt). Bei *euglyptoides* entstehen in „gemischten" Paaren ebenso charakteristische *asymmetrische* Bilder, und zwar fast ausnahmslos, d. h. von zufälligen, außerhalb des Kopulationspaars liegenden mechanischen Störungen abgesehen, immer: die obere Theke, der der RK anliegt, die also die Hypotheka ist, bleibt mit ihrem äußeren Rand am Rand der unteren Epitheka hängen, wahrt hier also den Kontakt mit ihr und dreht sich um diesen Punkt aufwärts, während die obere

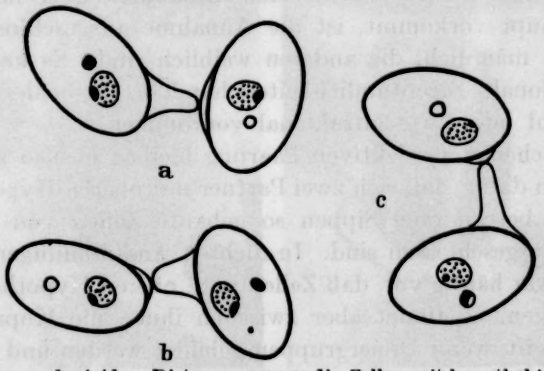


Abb. 4a—c. Var. *euglyptoides*. Distanzpaarung, die Zellen mit hypothekischer rapheloser Schale bilden den Kopulationsschlauch; hochliegende Richtungskörper schwarz, tiefliegende konturiert dargestellt. — Maßstab und Präparation wie Abb. 3

Theke des anderen Partners, da sie die Epitheka ist, nach außen weggedrückt und über den Rand der unteren Theke überschoben wird (Abb. 1b, 3b, 5b). Auch wenn beide Theken in den späteren Stadien maximal aufgeklappt sind, liegt die obere Hypotheka mit ihrem äußeren Rand an ihrem ursprünglichen Ort, während die obere Epitheka auswärts verschoben ist (Abb. 3b). Außerdem stellt sich die obere Hypotheka nur mäßig auf, während die obere Epitheka sich ± vertikal stellt (Abb. 3b, und 5b). In Paaren, deren beide oberen Theken Epitheken sind, werden *beide* nach außen symmetrisch über die Ränder der Hypotheken überschoben, verhalten sich also wie die Theken bei anderen isogamen Sippen.

Als Folge des verschiedenen Widerstands, den die beiden oberen Theken in „gemischten" Paaren ausüben, stellt sich in den späteren Stadien eine leichte Asymmetrie des fusionierten Protoplasten und eine leichte Verschiebung der Zygote gegen den Partner hin ein, der die Epitheka oben hat (Abb. 3b). Es wird dadurch trotz konstitutioneller Isogamie eine gewisse bewegungsphysiologische Anisogamie vorgetäuscht, die oberflächlich betrachtet an das Verhalten der anisogamen var. *pseudolineata* erinnert. Bei dieser nimmt die eine Partnerzelle die Zygote auf,

die andere gibt ihren Gameten ab (GEITLER 1927, 1932). Dabei handelt es sich aber um eine konstitutionelle Eigentümlichkeit der Geschlechtsdifferenzierung; im übrigen haben beide Partner die gleiche Thekenkombination (vgl. auch die „Besprechung").

Die RK-Bildung nach verschiedenen Richtungen in einem Paar ist mindestens 8mal häufiger als die gleichsinnige Bildung nach unten. Da in einer Population beiderlei Zelltypen gleich häufig vertreten sind, bedeutet das von der Erwartung stark abweichende Zahlenverhältnis, daß die Paarung nicht zufällig, sondern selektiv erfolgt. Die Paarung von Zellen mit hypothekischen Rapheschalen, die bei anderen Sippen die einzig mögliche ist, wird hier fast nur ausnahmsweise vollzogen. Da sie aber überhaupt vorkommt, ist die Annahme ausgeschlossen, daß die einen Zellen männlich, die anderen weiblich sind. Es kann sich auch nicht um klonale Eigentümlichkeiten handeln, da beiderlei Paarungstypen sowohl inter- wie intraklonal vorkommen.

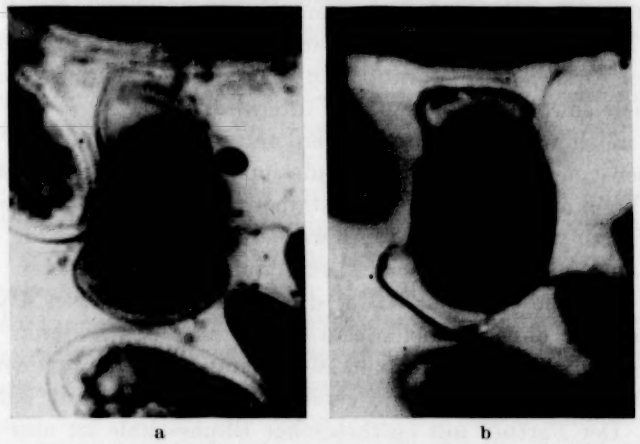
Die Ursachen der selektiven Paarung bleiben ebenso ungeklärt wie die Ursachen dafür, daß sich zwei Partner mit oberen Hypotheken nicht paaren und bei anderen Sippen so gebaute Zellen von der Paarung überhaupt ausgeschlossen sind. In dichten Ansammlungen von Paaren kommt es zwar häufig vor, daß Zellen mit „oberen Hypotheken" nebeneinander liegen, es findet aber zwischen ihnen nie Kopulation statt. Das gleiche gilt, wenn Dreiergruppen gebildet werden und zwei Partner „obere Hypotheken" besitzen: die Kopulation erfolgt immer zwischen einem dieser Partner und dem dritten mit „unterer Hypotheka".

Einen gewissen Anhaltspunkt gibt aber vielleicht die Tatsache, daß in gemischten Paaren in der Regel die Meiose in dem Partner beginnt, der eine hypothekische Rapheschale besitzt. Die Beobachtung von 70 Paaren, deren einer Partner den RK gebildet hatte, während sich der andere noch in meiotischer Prophase — Leptotän, Pachytän oder Diakinese — oder seltener in der I. Metaphase befand, ergab, daß in 65 Fällen der RK unten lag, also nur in 5 Fällen der Partner mit „oberer Hypotheka" vorauseilte. Die starke Abweichung von dem Zufallsverhältnis 1:1 ist nur so deutbar, daß sich die Partner mit der hypothekischen Rapheschale in einem anderen Zustand als die anderen befinden, daß die zweierlei Zellen also physiologisch ungleichwertig sind. Dieser Zustand kann sich offenbar schon vor Beginn der Meiose auswirken und dazu führen, daß sich die verschieden gestimmten Zellen bevorzugt paaren.

Als Ursache der verschiedenen physiologischen Stimmung kann in Betracht gezogen werden, daß die zweierlei Zellen eine verschiedene Vergangenheit haben: die mit der „oberen Epitheka" sind, entsprechend dem Teilungsschema der Diatomeen und der Lebensweise von *Cocconeis*, aus Tochterzellen entstanden, die auf einer „umgekehrt" gebauten

Schwesterzelle aufsaßen und von ihr herabgekrochen sind. Insofern unterscheiden sie sich also von der anderen Tochterzelle — die allerdings zu irgendeinem anderen Zeitpunkt ebenfalls zu kriechen vermag. Abgesehen von diesem Umstand, kann es sich nur noch um ganz unbekannte Beziehungen zwischen Thekenkombination und Physiologie des Protoplasten handeln.

Es zeigen sich bei *Cocconeis* allerdings auch noch andere unerwartete Eigentümlichkeiten. Die Paarung erfolgt normalerweise in einer Ebene.



a b

Abb. 5 a u. b. Ein Kopulationspaar mit junger Zygote von var. *euglyptoides* bei tiefer (a) und hoher (b) Einstellung im Mikroskop; in a sieht man die beiden Rapheschalen, die im Bild untere gehört zur Hypotheka, an ihr der Richtungskörper, die andere zur Epitheka; in b die beiden — typisch verschieden weit — aufgeklappten raphelosen Schalen, im Bild oben die mäßig schräg gestellte Hypotheka, an ihr der Richtungskörper (im Profil), im Bild unten — senkrecht stehend — die Epitheka. — Wie Abb. 2

In dieser können die Partner scheinbar ganz beliebige Stellungen zueinander einnehmen. Es können also die Apikalachsen parallel oder in einer Geraden liegen oder miteinander verschiedene Winkel einschließen (Abb. 2). Eine der möglichen Lagen ist die, daß die Apikalachsen rechtwinkelig zueinander ausgerichtet sind, und zwar derart, daß die „Spitze" des einen Partners auf die Breitseite des anderen weist, und zwar auf deren Mitte oder einem Ende genähert. Der rechte Winkel kann auch in einen spitzen übergehen, wobei die Spitze des einen Partners noch immer auf die Breitseite des anderen gerichtet bleibt (Abb. 3 b, 4 a/b, 5). Eine wahllose Auszählung von 340 Paaren ergab, daß sich unter ihnen 116 Paare befanden, deren einer Partner in dieser Weise rechtwinkelig oder bis zu einer Neigung von 45° zum anderen orientiert war, während 224 Paare sämtliche andere Stellungen zeigten. Das Verhältnis von rund 1:2 erscheint „gefühlsmäßig" betrachtet auffallend

hoch (eine exakte mathematische Behandlung dürfte wohl ausgeschlossen sein)[1].

Viel auffallender ist aber der Umstand, daß in solchen Paaren die Partner, die mit der Spitze auf den anderen weisen, stark überwiegend eine hypothekische Rapheschale besitzen, daß also die beiden Zelltypen keineswegs zufallsgemäß auf die beiden Partner verteilt sind. Das Verhältnis von Paaren mit „hinweisendem, obenhypothekischem" Partner zu umgekehrt kombinierten Paaren zu Paaren mit zwei unteren Hypotheken betrug 95:11:10. Das Verhältnis 95:11 weicht so stark von dem zu erwartenden 1:1 ab, daß es sich um keinen bloßen Zufall handeln kann. Es bestehen also gegen jede Erwartung auch bestimmte Beziehungen zwischen Membranbau und Paarungsstellung. Auch diese zeigen sich sowohl in Klonen wie interklonal.

Schließlich wirkt sich die Thekenkombination vermutlich auch bei der einseitigen Bildung des Kopulationsschlauchs aus. Seine Entstehung kann allerdings nur bei Distanzpaarung verfolgt werden und es lassen sich nur wenige geeignete Altersstadien auffinden[2]. In 12 beobachteten Paaren mit verschiedener Thekenkombination wurde er, wie auch bei var. *euglypta* (GEITLER 1948) durch Austreiben einer Papille des einen Partners ohne nennenswerte Beteiligung des anderen Partners gebildet (Abb. 4). Dabei wurde in 10 Fällen die Papille von dem Partner mit epithekischer Rapheschale gebildet und nur in zwei Fällen vom anderen. Der Partner mit epithekischer Rapheschale ist also in dieser Hinsicht, umgekehrt wie beim Eintritt in die Meiose, im allgemeinen frühreifer — wofern die kleinen Beobachtungszahlen eine Verallgemeinerung zulassen. Bei gleicher Thekenkombination entsteht der Kopulationsschlauch naturgemäß, wie bei den anderen Sippen, aus einer Zelle mit hypothekischer Raphenschale. Es scheint also bei *euglyptoides* eine bestimmte Beziehung zwischen Membranbau bzw. durch den entsprechenden physiologischen Zustand des Protoplasten und der Bildung des Kopulationsschlauchs zu bestehen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit, daß etwa die Papille an einer Stelle stärkerer Krümmung des Schalenrands — weil mechanisch leichter möglich — gebildet wird (Abb. 4a), wird durch gegenteilige Fälle ausgeschlossen (Abb. 4c). Außerdem zeigt die unmittelbare Beobachtung, daß die Theken beider Partner gleich

[1] Auszählungen bei *klinoraphis* ergaben das Verhältnis 60:134, bei *pseudolineata* 26:53; bei dieser, die anisogam ist, kann der eine oder andere Partner männlich oder weiblich sein, die Stellung hat also sicher nichts mit einem Geschlechtsunterschied zu tun. — Vgl. im übrigen die Regeln, die den Paarungsstellungen bei *Eunotia arcus* zugrunde liegen; hier lassen sie sich allerdings z. T. aus dem Zellbau verstehen (GEITLER 1951b).

[2] Bei enger Kontaktpaarung erübrigt sich die Fragestellung, weil einen geringen Beitrag zur Bildung des Kopulationsschlauchs auf jeden Fall auch der andere Partner leistet.

weit klaffen; es bildet ja auch der andere Partner Gallerte, nur wächst sie nicht zu einem Schlauch heran. Für den Ort der Entstehung ist, wie bei den anderen Sippen, allein die größtmögliche Annäherung an den anderen Partner maßgebend.

Besprechung

Alle bisher untersuchten Sippen von *Cocconeis pediculus* und *placentula* besitzen die fortpflanzungsbiologische Gemeinsamkeit, daß die differentielle Zellteilung, die einen Gameten und einen abortierenden Richtungskörper liefert, derart abläuft, daß der RK an der Seite der Hypotheka gebildet wird. Bei var. *euglyptoides* kann in sexualisierten Zellen die Hypotheka unten, also mit einer Rapheschale, oder oben mit rapheloser Schale auftreten. Doch besteht die Einschränkung, daß Zellen mit hypothekischer rapheloser Schale untereinander nicht kopulieren und daß die Paarung von Zellen mit epithekischer rapheloser Schale gegenüber der „gemischten" Paarung stark zurücktritt. Aus den beobachteten 70 Fällen ungleichzeitiger Meiosen ist vielleicht zu schließen, daß der Impuls zur sexuellen Aktivierung von den Zellen mit epithekischer rapheloser Schale ausgeht. Weshalb aber die Paarung selektiv mit anders gebauten Zellen erfolgt, bleibt rätselhaft; eine bloße ad hoc-Annahme wäre, diese für leichter reaktionsfähig zu halten. Bei den anderen *Cocconeis*-Sippen besteht außerdem die strenge Einschränkung, daß überhaupt nur Zellen mit hypothekischer Rapheschale sexualisiert werden können und paarungs- und kopulationsfähig sind; die Gründe sind ebenfalls unbekannt. Einen gewissen allgemeinen Anhaltspunkt gibt nur die Überlegung, daß sich die beiderlei Zellen durch ihre Vorgeschichte — als Tochterzellen oben bzw. unten liegend (vgl. S. 592) — unterscheiden und daher wohl eine verschiedene physiologische Stimmung mitbringen können.

Das Vorhandensein einer polaren Differenzierung — oder eines „Gefälles" oder „Gradienten" — in pervalvarer Richtung, wie es bei allen *Cocconeis*-Sippen während der Meiose besteht, und das sich in der differentiellen Cytokinese durch die Förderung der epithekischen und Hemmung der hypothekischen Seite des Protoplasten kundgibt, steht nicht ohne Analogie da. Die gleiche Polarität ist bei *Eunotia*-Arten gegeben, die ebenfalls einen Gameten je Mutterzelle in der Folge einer inäqualen differentiellen Teilung bilden. Doch ist, umgekehrt wie bei *Cocconeis*, die geförderte Seite bei *Eunotia* die hypothekische, der abortierende Restprotoplast entsteht also auf der Seite der Epitheka[1]. Diese regelmäßige Lage ist aber nicht verbunden mit einem dorsiventralen

[1] Bemerkenswerterweise geschieht das gleiche bei der Bildung von Innenschalen, die ebenfalls an den Ablauf einer inäqualen Zellteilung gebunden ist (Geitler 1953).

Zellbau in pervalvarer Richtung, es gibt also keine „obere" und keine „untere" Epi- oder Hypotheka und alle Zellen sind gleichwertig und kopulieren. Damit hängt ein weiterer Unterschied gegenüber *Cocconeis* zusammen: die pervalvare Polarität äußert sich schon vor der differentiellen Teilung in einer polaren Schichtung bzw. Förderung und Hemmung der Inhaltsbestandteile — Chromatophoren, bestimmte Plasmaeinschlüsse —, ergreift also den — im Unterschied zu *Cocconeis* von Anfang an nicht polarisierten — ganzen Protoplasten, bis dann die Cytokinese die schon präformierte Trennung wirklich vollzieht, während bei *Cocconeis* nichts dergleichen geschieht. Die auch in vegetativen Zellen von *Cocconeis* vorhandene pervalvare Polarität, die sich in der Lage des Chromatophors und Kerns ausdrückt, bleibt unverändert, gleichgültig, ob die obere Theka eine Epi- oder Hypotheka ist. Die verschiedene Richtung des Gradienten, der sich in der verschiedenen Richtung der Bildung des RK manifestiert und durch die verschiedene Lage von Epi- und Hypotheka markiert ist, drückt sich morphologisch in mikroskopischen Dimensionen nicht aus. Es wäre an sich denkbar, daß, wenn der Richtungskörper nach oben gebildet wird, eine Verlagerung des Chromatophors nach unten vorangeht. Der Grund, daß dies nicht geschieht, liegt darin, daß bei *Cocconeis* eine inhärente Polarität im Zusammenhang mit dem dorsiventralen Zellbau gegeben ist: so besitzt der Chromatophor gar keine Beziehung zu Epi- oder Hypotheka, dafür aber zu „oben" und „unten" bzw. rapheloser und Rapheschale; andernfalls läge er in den Populationen einmal oben und einmal unten. Zu der in jeder vegetativen Zelle bestehenden pervalvaren Polarität, die nicht umkehrbar ist, tritt nach der Paarung eine von ihr unabhängige Polarität in Erscheinung, die mit der Thekenkombination wechselt; — wenigstens bei *euglyptoides*; bei den anderen Sippen besteht ja eine fixe Beziehung auch zwischen der sichtbaren „vegetativen" Polarität und der Richtungskörperbildung, und zwar derart, daß sich gewissermaßen beide Polaritäten decken. Bei *Eunotia* gibt es keine inhärente Polarität, da die Zellen nicht dorsiventral gebaut sind, und die meiotische tritt allein und voll in Erscheinung.

Für das Problem der Geschlechtsdifferenzierung ergeben die Beobachtungen keine neuen Gesichtspunkte, doch bildet var. *euglyptoides* ein auffallendes Beispiel einer *vorgetäuschten* Anisogamie. Die isogame Kopulation ist ebenso konstitutionell wie bei anderen Varietäten. Doch wird sie bei „gemischten" Paaren (mit verschiedener Thekenkombination) durch den geringen Widerstand, den die obere Epitheka leistet, und durch den größeren, bei normalem Verlauf unüberwindlichen Widerstand, den die obere Hypotheka dem Druck der Kopulationsgallerte entgegensetzt, modifiziert: nach völlig isogamem Beginn der Gametenfusion (Abb. 2) wird die heranwachsende Zygote gegen den Partner mit der oberen

Epitheka verschoben, da diese nachgibt und über den Rand der Rapheschale hinausgeschoben wird, wodurch ähnlich asymmetrische Bilder wie bei einer anisogamen Kopulation entstehen (Abb. 1 b, 3 b). Besonders auffallend ist dies meist bei rechtwinkeliger Stellung der Apikalachsen: in diesem Fall wird als *zusätzliches* Geschehen der Protoplast, der mit der „Spitze" auf den anderen weist, von diesem gewissermaßen angesaugt, was noch auffallender wird, wenn sich damit ein entsprechender Größenunterschied der Partner kombiniert (das gleiche kommt bei der isogamen *klinoraphis* mit gleichbleibender Thekenkombination vor; GEITLER 1932, Abb. 72 c). Die scheinbare Anisogamie von *euglyptoides* ist also rein mechanisch verursacht und nicht der Ausdruck eines Geschlechtsunterschieds. Im Gegensatz hierzu besitzt *pseudolineata* gleichbleibende Thekenkombination, ist aber anisogam; es ist also nicht ein mechanischer Widerstand, der die Anisogamie verursacht.

Die Bildung des Kopulationsschlauchs durch nur einen Partner und die frühere Reifung eines Partners könnten — müssen aber nicht — als Geschlechtsmerkmale aufgefaßt werden. Wenn es sich um solche handelt, sind sie jedenfalls nicht an eine bestimmte Thekenkombination gebunden, da beide Verhaltensweisen auch in Paaren mit zwei hypothekischen Rapheschalen vorkommen, in welchen Fällen also ein Partner mit hypothekischer Rapheschale, entgegen der Regel in gemischten Paaren, *keinen* Kopulationsschlauch bildet und ein Partner, entgegen der Regel in gemischten Paaren, *später* reift.

Das stark überwiegende Auftreten von gemischten Paaren könnte auf den ersten Blick hin so gedeutet werden, als ob an von vornherein gleichartigen Partnern erst durch die Paarung eine „einverständliche" Beeinflussung stattfände, z. B. in der Weise, daß der zuerst reifende Partner mit hypothekischer Rapheschale — meist — die Umstellung der Polarität im anderen induziert. Für *Cocconeis* läßt sich zeigen, daß dies nicht zutrifft, sondern daß selektive Paarung vorliegt. Der eingangs erwähnte Fall von *Epithemia*, wo zwei Gameten überwiegend einverständlich orientiert werden, läßt sich aber nicht in dieser oder einer ähnlichen Weise erklären. Da in pervalvarer Richtung keine Dorsiventralität besteht, gibt es, wie bei *Eunotia*, keine verschiedenen Thekenkombinationen und alle Zellen sind in dieser Hinsicht gleichwertig. Es wurde aber dennoch überprüft, ob eine Korrelation vielleicht zwischen den beiden möglichen Lagen der Gameten und den zwei möglichen Lagen der Epi- und Hypotheken in einem Paar besteht. Es kann ja in einem Paar die Epitheka des einen Partners „rechts", die Hypotheka „links" liegen und im anderen Partner die Anordnung gleich- oder gegensinnig sein. Es ergab sich für Gleich- zu Gegensinnigkeit das Verhältnis 50:53, was zu erwarten war, da die beiden Partner ja insofern gleich gebaut sind, als sich die Gegensinnigkeit durch Drehung in der Ebene in

Gleichsinnigkeit überführen läßt. Das Verhältnis der beiden möglichen Lagen der Gameten ist dagegen 4:1.

Die Beobachtungen an *Cocconeis* ergaben das Vorhandensein von gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Bauplan, Membranbau und Ablauf der Kopulation, die wohl niemand erwartet hätte. Die Gebundenheit der Kopulation an eine bestimmte Thekenkombination bei den früher behandelten Sippen bedeutet eine 50%ige Einschränkung der Fertilität, die im Fall von *euglyptoides* wieder z. T. aufgehoben ist. Es zeigt sich, daß die Kopulation an eine große Anzahl sozusagen reizphysiologischer Organisationsmerkmale gebunden ist, die sich vorläufig nur als solche erkennen lassen, ohne daß ein tieferer Einblick möglich wäre.

Zusammenfassung

Früher untersuchte Sippen von *Cocconeis* zeigen die Gesetzmäßigkeit, daß Zellen nur paarungsfähig sind, wenn ihre Rapheschale der Hypotheka angehört. Der Richtungskörper entsteht dann, in der Folge einer inäqualen, differentiellen Cytokinese, gesetzmäßig an der Seite der Hypotheka, also in bezug auf die festsitzende Zelle unten. Bei var. *euglyptoides* sind außerdem auch Zellen sexualisierbar, welche die Rapheschale als Epitheka ausgebildet haben; sie können sich aber nicht mit ihresgleichen paaren. Die Paarung erfolgt überwiegend zwischen Partnern mit verschiedener Thekenkombination und nur in $^1/_8$ der Fälle zwischen Partnern, deren Rapheschale der Hypotheka angehört. Die bei anderen Sippen bestehende 50%ige Sterilität wird dadurch entsprechend eingeschränkt.

Die fixe Beziehung zwischen Richtungskörperbildung und Hypotheka ist auch bei *euglyptoides* erhalten, daher entsteht der Richtungskörper in Zellen mit „oberer" Hypotheka oben; die Polaritätsachse, welche den Ablauf der meiotischen Cytokinese kontrolliert, ist also in bezug auf den Protoplasten um 180° gedreht. Es sind also zweierlei Polaritäten zu unterscheiden: die den vegetativen Zellen inhärente Polarität, die sich in der Heteropolie der Pervalvarachse ausdrückt und nicht umkehrbar ist, und die während der Meiose auftretende, die bei *euglyptoides* mit ersterer gleich- oder gegensinnig wirken kann, während sie bei anderen Sippen immer gleichsinnig wirkt.

Bei der Kopulation zeigen sich außerdem bestimmte (nicht zufällige) Beziehungen zwischen der Thekenkombination und der Lage der Partner zueinander, dem Eintritt in die Meiose und vermutlich der Bildung des Kopulationsschlauchs. Auch hieraus ist auf eine verschiedene physiologische Disposition der Zellen mit verschiedener Thekenkombination zu schließen.

Infolge des verschiedenen Widerstands, den die oberen Theken in Paaren mit verschiedener Thekenkombination bei ihrem Aufklappen

während der Bildung der Kopulationsgallerte leisten, entstehen bei der konstitutionell isogamen var. *euglyptoides* asymmetrische Kopulationsbilder, die eine bewegungsphysiologische Anisogamie, wie sie bei anderen Sippen konstitutionell ist, bloß vortäuschen.

Literatur

GEITLER, L.: Somatische Teilung, Reduktionsteilung, Kopulation und Parthenogenese bei *Cocconeis placentula*. Arch. Protistenk. **59**, 506—549 (1927). — Der Formwechsel der pennaten Diatomeen. Jena: Gustav Fischer 1932 [auch Arch. Protistenk. **78**, 1—226 (1932)]. — Gameten und Auxosporenbildung von Synedra ulna im Vergleich mit anderen Diatomeen. Planta (Berl.) **30**, 551—566 (1939). — Zur Kenntnis der Rassenbildung und des Kopulationsverhaltens der Diatomee Cocconeis placentula und ihres Epiphytismus. Bot. Notiser **1948**, 84—92. — Zelldifferenzierung bei der Gametenbildung und Ablauf der Kopulation bei Eunotia. Biol. Zbl. **70**, 385—398 (1951a). — Kopulation und Formwechsel von Eunotia arcus. Öst. bot. Z. **98**, 292—337 (1951b). — Über differentielle Teilung und einen im Zellbau begründeten, kopulationsbegrenzenden Faktor bei der Diatomee Cocconeis. Z. Naturforsch. **7b**, 411—414 (1952). — Abhängigkeit der Membranbildung von der Zellteilung bei Diatomeen und differentielle Teilungen im Zusammenhang mit der Bildung von Innenschalen. Planta (Berl.) **43**, 75—82 (1953). — Automixis, Geschlechtsbestimmung und Pyknose von Gonenkernen bei Cymbella aspera. Planta (Berl.) **47**, 359—373 (1956). — Die sexuelle Fortpflanzung der pennaten Diatomeen. Biol. Rev. **32**, 261—295 (1957). — HARTMANN, M.: Die Sexualität, 2. Aufl. Stuttgart (1956). — KÖHLER, K.: Entwicklungsgeschichte, Geschlechtsbestimmung und Befruchtung bei Chaetomorpha. Arch. Protistenk. **101**, 223 bis 268 (1956).

Prof. Dr. L. GEITLER, Wien III/40 (Österreich),
Botan. Inst. u. Garten der Univ., Rennweg 14

Planta, Bd. 51, S. 600—634 (1958)

Aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung,
Abteilung für Plasmavererbung, Köln-Vogelsang

UNTERSUCHUNGEN ZUR MUTATION PLASMATISCHER ERBTRÄGER, BESONDERS DER PLASTIDEN*

I. Teil

Von

PETER MICHAELIS

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Februar 1958)

A. Einleitung

Unsere Kenntnisse über Mutationen im Zellplasma und in Plastiden sind noch außerordentlich gering. Noch vor kurzer Zeit fand man in der Literatur die Meinung vertreten, daß Plasmamutationen unbekannt seien. Das war schon damals nicht ganz berechtigt, denn einzelne längst bekannte Beispiele einer plasmatischen Vererbung, wie z. B. die von SIRKS (1938) beschriebene Knospenvariation von *Phaseolus*, sind höchstwahrscheinlich im Gefolge einer Plasmamutation entstanden. Andere kritische Fälle, die nach unseren heutigen Kenntnissen wahrscheinlich auf Plasmamutation beruhen, sind mangels geeigneter Untersuchungsmethoden nicht genauer untersucht worden. Seit die plasmatische Vererbung mehr Berücksichtigung fand, haben sich die Fälle gemehrt, bei denen in den verschiedensten Objekten vielfache Unterschiede des plasmatischen Erbgutes nachgewiesen werden konnten. GUSTAFSSON und v. WETTSTEIN (1958) geben in ihrem zusammenfassenden Artikel über Plasmon- und Plastommutationen[1] einen Überblick über diese Fälle. Nun ist aber eine Einordnung aller Beispiele von Plasmon-Unterschieden unter den Begriff einer Plasmamutation nur bedingt richtig. Sicherlich ist das Vorkommen von Plasmamutationen letzten Endes die Voraussetzung dafür, daß Plasmon-Unterschiede entstehen können. Die Entstehung von Plasmon-Unterschieden muß aber

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. O. RENNER zum 75. Geburtstag gewidmet.

[1] Wie in früheren Publikationen wird vom Verfasser unter Plasmon im Gegensatz zum Genom die Summe aller extranucleären Erbträger der Zelle verstanden, ohne daß dabei eine weitere Unterscheidung beabsichtigt ist. Plastom ist die Summe aller in den Plastiden einer Zelle lokalisierten Erbträger. Cytoplasmon ist die Summe der plasmatischen Erbträger mit Ausschluß der in den Plasmaorganellen lokalisierten Erbeinheiten. Plastidom ist die Summe der Plastiden einer Zelle im morphologischen Sinn. Eine Zelle ist homoplastidisch, wenn sie gleichgestaltete Plastiden enthält, sie ist homo- bzw. heteroplastomatisch, wenn sie erbgleiche bzw. erbverschiedene Plastiden enthält.

keineswegs in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten von Plasmamutationen stehen. Bei den meisten Plasmondifferenzen ist nicht zu entscheiden, ob sie in unmittelbarer Folge einer Plasmamutation aufgetreten sind oder ob sie durch Umkombination von Plasmaeinheiten entstanden sind, die sich in unbekannten Zeiten im Verlaufe der phylogenetischen Entwicklung differenziert haben.

Sieht man von solchen Beispielen ab, so bleiben nur wenige Fälle, bei denen man von Plasmamutationen sprechen kann. Es sind vor allem zu nennen die Untersuchungen an *Paramaecium* von Sonneborn (1950, 1955) und seinen Mitarbeitern v. Dippell (1948, 1950), Levine (1953), Preer (1948, 1950) und Preer, Siegel und Stark (1953). Es wurde in Bestrahlungsversuchen die Inaktivierungsrate der Kappa-Partikel bestimmt und nach verschiedenen Behandlungen Mutationen extranucleärer Erbfaktoren gefunden. Weiterhin sind zu nennen die Versuche von Ephrussi (1953) und seiner Mitarbeiter (Ephrussi-Hottinguer 1951, Slonimski-Ephrussi 1949) an Hefen. Ephrussi vermutet, daß es sich in seinen Versuchen nicht um Mutation von Plasmapartikeln sondern um ihre Elimination unter dem Einfluß von Euflavin und Akriflavin handelt. Die Versuche wären damit mit Versuchen an Flagellaten zu vergleichen, bei denen es unter dem Einfluß von Streptomycin und anderen Agentien zu einer Hemmung der Plastidenteilung und damit zu einer Elimination der Plastiden und des Augenfleckes kommt (Robbins-Hervey-Stebbins 1953, Lwoff und Dusi 1935, Lwoff und Schaeffer 1949, Pringsheim 1941, 1948, Pringsheim und Pringsheim 1952, Provasoli und Mitarbeiter 1948, 1951). Mit diesen Versuchen an Einzellern liegen die ersten Ansätze für eine Mutationsanalyse plasmatischer Erbträger vor. Die Untersuchung einzelliger Organismen bietet dabei erhebliche Vorteile.

Bei höheren Organismen fehlen Untersuchungen über die Mutabilität des Plasmons völlig. Hier führt die Vielzelligkeit der Gewebe zu besonderen Schwierigkeiten, von deren Beherrschung wir zur Zeit noch weit entfernt sind. Trotzdem scheint es dringend notwendig zu sein, auch an höheren Organismen Mutationsversuche durchzuführen. Die bisherigen Versuche zur Plasmavererbung machen es sehr wahrscheinlich, daß der Umkombination der plasmatischen Erbeinheiten eine besondere Bedeutung für die Differenzierung und Determinierung der Gewebe im Verlaufe der Ontogenie zukommt. Damit gewinnt die Mutation plasmatischer Erbeinheiten erhöhtes Interesse für die Störung der Normogenese. Es ist daher kein Grund gegeben, die Mutationsversuche auf Einzeller zu beschränken.

Im Hinblick auf die Plastidenmutation liegen mehr Erfahrungen vor. Plastidenmutationen sind seit den ersten Versuchen von Correns

und BAUR immer wieder aufgefunden und untersucht worden (Literatur bei CASPARI 1948, CORRENS-F. v. WETTSTEIN 1937, GRANICK 1955, GUSTAFSSON-D. v. WETTSTEIN 1958, RENNER 1934, 1936, RHOADES 1946, 1955, WEIER-STOCKING 1952). Es ist bekannt, daß Plastidenmutationen spontan in einer Häufigkeit von einigen Promille vorkommen und daß unter dem Einfluß bestimmter Kerngene die Häufigkeit der Plastidenmutation erheblich zunehmen kann (ARNASON-WALKER 1949, ARNASON-HARRINGTON-FRIESEN 1946, IMAI 1936, MAZOTI 1950, PAL 1941, RHOADES 1943, 1946, WOODS-DU BUY 1951). Bestrahlungsversuche zur experimentellen Abänderung von Plastidenmerkmalen wurden von KNUDSON (1940) und MALY (1951, vgl. auch DÖPP 1937, HRUBY 1935, ROTTMANN 1939) an Farnprothallien durchgeführt. Leider ließ die Ungunst der Objekte keine weitere genetische Analyse zu, so daß offen bleiben muß, ob die Abänderungen der Plastidenmerkmale auf Mutation mendelnder Gene oder auf Mutation plasmatischer Erbfaktoren beruhen. Ganz allgemein leiden alle Versuche über die Vererbung von Plastidenmerkmalen darunter, daß nicht beachtet wurde, daß eine nicht mendelnde, mütterlich vererbte Plastidenabänderung nicht nur auf einer Plastidenmutation beruhen muß, sondern ebensogut durch eine Mutation extraplastidaler, plasmatischer Erbträger verursacht sein kann.

Der Verfasser führt seit vielen Jahren Mutationsversuche an *Epilobium* durch. Über lange Zeit wurden keine Plasmon- und Plastidenmutationen aufgefunden. Heute gibt sich zu erkennen, daß solche negativen Ergebnisse keineswegs auf einer besonders hohen Stabilität der plasmatischen Erbeinheiten beruhen müssen. Es waren die theoretischen Grundlagen einer Plasmonanalyse zu wenig bekannt, um die Mutationsversuche in richtiger Weise durchführen zu können. Erst als an den sehr häufigen, spontan auftretenden Plasmonabänderungen einiger *Epilobium*-Bastarde die wichtigsten Prinzipien einer Plasmonanalyse erkannt wurden (Lit. MICHAELIS 1950, 1954a, b, 1958) und als in den radioaktiven Isotopen besonders stark mutagene Agentien gefunden wurden, gelang es, in größerer Zahl Mutationen der Plastiden und anderer plasmatischer Erbträger aufzufinden. Diese Mutationsversuche genügen aber noch keineswegs den Anforderungen, die wir an quantitative Mutationsversuche stellen, da wahrscheinlich nur ein Bruchteil der aufgetretenen Mutanten gefunden werden konnte. Die Versuche sollten im wesentlichen dazu dienen, eine größere Zahl von Plasmonmutationen zu erzeugen. Nachdem aber demnächst einzelne der in den Mutationsversuchen erhaltenen Plasmotypen zu schildern sind (MICHAELIS 1957a, b und weitere), erscheint es notwendig, auch über die Mutationsversuche selbst zu berichten.

B. Zur Theorie der Plasmonmutationen

Wenn Kern- und Plasmamutationen miteinander verglichen werden, so ist es naheliegend, von den Erfahrungen an Kernmutationen auszugehen und die Plasmamutationsversuche unter ähnlichen Gesichtspunkten durchzuführen und zu betrachten. Ein solches Verfahren ist aber sehr mißlich, wenn nicht gleichzeitig die Unterschiede im Bau und Verhalten zwischen chromosomalen und plasmatischen Erbträgern berücksichtigt werden. Diese Unterschiede können ganz andere Untersuchungsmethoden und ganz andere Beurteilungen der Ergebnisse erfordern. Es wird vor der Durchführung von Mutationsversuchen zweckmäßig sein, diese Verhältnisse nach Möglichkeit theoretisch zu klären. An Hand der ersten aufgefundenen Plasmamutanten wird dann die Richtigkeit dieser Überlegungen zu prüfen und unsere Kenntnisse werden zu korrigieren und zu erweitern sein. Erst wenn auf diese Weise eine tragfähige Basis geschaffen ist, können exakte Mutationsversuche durchgeführt und den Kernmutationsversuchen an die Seite gestellt werden. Voreilig gezogene Parallelen können auf Irrwege und zu Fehlschlüssen führen.

Man kann darüber diskutieren, ob die plasmatischen Erbeinheiten partikulärer Natur sind oder nicht. Meines Erachtens trifft eine solche Unterscheidung nicht die für den Erbgang wesentlichen Fakten und kann zu sehr verschiedenen Konsequenzen führen je nach den Vorstellungen, die man mit dem Begriff des Partikels verbindet. Kaplan (1957) diskutiert die Möglichkeit, daß eine Plasmavererbung auf der identischen Weitergabe von spezifischen Reaktionscyclen beruhen könnte, deren substantielle Reaktionspartner weder durch identische Selbstreproduktion vermehrt werden noch mutabel sind. Im Gegensatz hierzu würden Erbeinheiten (= Plasmagene) stehen, die z. B. durch Teilung identisch reproduziert werden und mutabel sind. Über die Natur solcher plasmatischer Erbeinheiten und über ihre eventuellen Unterschiede gegenüber den Kerngenen ist derzeit nichts bekannt. Es ist zu hoffen, daß im Laufe der Zeit die Mutationsversuche hierüber Auskunft geben. Selbst wenn aber die Plasmagene sich substantiell nicht wesentlich von den Kerngenen unterscheiden sollten und in ähnlicher Weise auf mutagene Agentien reagieren sollten, so können doch durch die größeren Zahlen homologer Plasmaeinheiten je Zelle, durch Zusammenfassung der Plasmagene zu Systemen höherer Ordnung und durch ihr Verhalten im Verlauf der Zellteilungs- und Generationenfolgen erhebliche Unterschiede gegenüber der Kernvererbung entstehen. Im folgenden seien diese Eigenheiten der Plasmamutation kurz erörtert.

I. Die Zahl gleichartiger Plasmoneinheiten je Zelle

Wildman und Cohen (1955) geben eine Schätzung der Zahl intracellulärer Organellen und submikroskopischer Partikel je Zelle, die in

Tabelle 1 wiedergegeben ist. Es kann wohl sicher angenommen werden, daß diese Zahlen bei den einzelnen Objekten und in den verschiedenen Zelltypen, vielleicht sogar unter verschiedenen Umwelteinflüssen erheblichen Schwankungen unterworfen sind. Nach den Beobachtungen des Verfassers z. B. werden bei *Epilobium* so hohe Plastidenzahlen, wie sie Tabelle 1 angibt, nur in einzelnen Zelltypen der Blätter erreicht, während in den Zellen der Meristeme die Zahlen wesentlich niedriger (etwa 7—20) liegen. Trotzdem mögen die Zahlen der Tabelle einen Eindruck geben, mit welchen Zahlenbereichen bei den verschiedenen plasmatischen Erbträgern gerechnet werden muß.

Tabelle 1. *Näherungsweise Zahlen der intracellulären Organellen und submikroskopischen Partikel je Zelle* (nach WILDMAN-COHEN 1955)

Zellkern . . .	1
Chloroplasten .	100
Mitochondrien .	700
Sphärosomen .	300
Partikel der Cytoplasma-Fraktion I .	100000000

Aus den Erfahrungen über die Mutation chromosomaler Gene können wir annehmen, daß stets nur einzelne Erbeinheiten mutieren. In solch einem Falle wird der Effekt eines einzelnen mutierten Erbträgers von den Wechselbeziehungen zu den zahlreichen übrigen homologen (und nichthomologen) Erbeinheiten abhängig sein. Nur wenn eine der zahlreichen Einheiten allein sich zu manifestieren vermag und nach ihrer Mutation zu erkennbaren Abänderungen führen kann, nur in diesem Falle wird die Mutation sofort sichtbar werden. In allen anderen Fällen wird die Mutation erst dann aufgefunden werden können, wenn die mutierten Einheiten in den Zellen vermehrt und angereichert werden. Bei einer gleichmäßigen Vermehrung mutierter und normaler Erbträger und bei zufallsgemäßer Verteilung der Erbträger während der Zellteilungen werden für eine derartige Anreicherung mutierter Erbträger sehr lange Zeiträume benötigt. Bei sehr großen Zahlen kann eine Entmischung kaum mehr eintreten (vgl. Abschnitt III). Allein die große Zahl homologer Plasmaeinheiten je Zelle würde einen plausiblen Grund zur Erklärung der Tatsache abgeben, daß zwar Plasmaunterschiede aufzufinden sind, daß aber noch kaum eindeutige Plasmamutationen gefunden wurden. Wir haben aber keinen Grund, aus solchen Erfahrungen auf ein egeringere Mutabilität der plasmatischen Erbträger zu schließen, solange wir nicht die Vermehrung und die Umkombination der plasmatischen Erbeinheiten überblicken.

Soweit auf Grund der bisherigen, noch sehr fragmentarischen Untersuchungen (MICHAELIS 1957a, b) zu urteilen ist, sind zwei Typen von Wechselwirkungen plasmatischer Erbträger zu unterscheiden. Der eine Typus, der von der Dominanz der Kerngene her wohlbekannt ist, scheint auch bei der extranucleären Vererbung von Plastidenmerkmalen vorzukommen: Eine einzige Erbeinheit entscheidet darüber, ob sich eine

Mutante manifestiert oder nicht. Bisher sind auch bei der Vererbung von Plastidenmerkmalen nur Fälle bekannt geworden, in denen der Wildtyp „dominant" über die Mutante war. In solchen Fällen vermag sich die Mutation erst zu manifestieren, nachdem die Zellen im Hinblick auf den mutierten Erbträger homoplasmonisch geworden sind. Bei dem zweiten Typ scheint sich die Wirkung der in der Zelle befindlichen Erbträger zu addieren. Es kommen verschiedene Abstufungen in dem Manifestationsgrad der Mutante vor, die von der Quantität der mutierten Erbträger je Zelle abhängig sind. Auch in diesem Falle wird die Mutante erst dann deutlich erkannt werden können, wenn die mutierten Erbträger in der Zelle angereichert sind. In beiden Fällen muß sich also an die Mutation der Erbeinheiten eine Umkombination anschließen, damit die Mutation sichtbar werden kann.

II. Die Zusammenfassung plasmatischer Erbeinheiten zu Systemen höherer Ordnung

Die hier besprochenen, von der Zahl der Plasmaeinheiten abhängigen Eigenheiten der Plasmavererbung sind in noch viel stärkerem Maße zu berücksichtigen, wenn Plasmaorganellen betrachtet werden. Wenn Rhoades (1955) die Plasmavererbung in eine partikuläre und eine nichtpartikuläre Plasmavererbung gliedert, so stellt er eine Vererbung durch Plasmaorganellen wie Plastiden, Mitochondrien usw. einer Cytoplasmavererbung gegenüber. Genetisch entscheidend ist aber nicht der Organellcharakter der Erbeinheiten, sondern die Zahl der mutablen und umkombinierbaren Einheiten innerhalb der Organellen. Organellen, die nur eine mutable Erbeinheit enthalten, können sich genetisch ebenso verhalten wie Erbeinheiten, die nicht an Plasmaorganelle gebunden sind. Ganz anders müssen sich aber Plasmaorganellen verhalten, die eine größere Zahl homologer Erbeinheiten enthalten. Der Verfasser empfiehlt daher, bei genetischen Überlegungen zu unterscheiden zwischen poly„gen" zusammengesetzten Plasmaorganellen und zwischen mono„genen" Erbeinheiten, die teils den Charakter von Plasmaorganellen tragen oder aber submikroskopischen Plasma-Makromolekülen entsprechen könnten. Eine Mittelstellung könnten mehr oder minder stabile Cytoplasma-Aggregationen einnehmen, in denen mehrere Plasmaeinheiten in vielleicht reversibler Weise vereinigt werden. Auf sie braucht hier nicht näher eingegangen zu werden, da sie weniger für die Mutation als für die Umkombination des Erbplasmas bedeutungsvoll werden könnten.

Werden zahlreiche homologe Plasmaeinheiten zu Erbsystemen sui generis zusammengefaßt, so muß die Manifestation einer Plasmamutation noch mehr erschwert werden, als das schon durch die große Zahl homologer Plasmaorganellen je Zelle geschieht. Zu der Entmischung normaler und mutierter Organellen innerhalb der Zelle muß noch eine

Separierung normaler und mutierter Erbeinheiten innerhalb der Organellen hinzutreten. Betrachtet man aus diesem Gesichtswinkel die Plastidenmutation, so sollte es möglich sein, aus den Ergebnissen der Plastidenmutation Rückschlüsse über die genetische Struktur der Plastiden[1] zu ziehen. Entspricht die genetische Struktur der multigranulären Plastiden ihrem mikroskopisch sichtbaren Bau, so müßten multigranuläre Plastiden nahezu immutabel sein. An die eigentliche Mutation müßte in einem poly„genen" Plastid zuerst eine Entmischung normaler und mutierter Erbeinheiten im Verlaufe der Plastidenteilungen stattfinden, bis abgeänderte Plastiden auftreten können. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind hierfür zahlreiche Plastiden- und Zellteilungen notwendig. Wenn nicht gerade alle mutierten Erbeinheiten stets nur in ein Tochterplastid gelangen, so müßten nach Ablauf dieser Plastidenteilungen nahezu gleichzeitig in den Zellen einer Zelldeszendenz mehrere abgeänderte Plastiden auftreten können. An diese Entmischungsvorgänge innerhalb der Plastiden muß sich dann noch eine Entmischung der abgeänderten Plastiden innerhalb der Zellen anschließen, bis die Mutation in Form einer Scheckung aufgefunden werden kann. Nach den Erfahrungen an *Epilobium* dürfte die Zahl der Plastiden- und Zellteilungen, die noch nach dem Multigranulär-Werden der Plastiden stattfinden, kaum ausreichen, um Mutationen in multigranulären Plastiden sichtbar werden zu lassen.

Ganz anders liegen die Verhältnisse, wenn die Plastiden bzw. die Proplastiden nur jeweils eine mutable Einheit je Sorte enthalten. In diesem Falle müßten sofort mit der Mutation auch abgeänderte Plastiden entstehen. Bis zum Auffinden einer Plastidenmutante als Schecke müßte dann nur noch eine intracelluläre Plastidenentmischung durchlaufen werden.

Diese Überlegungen zeigen, daß in Verbindung mit Unterschieden in der genetischen Struktur der Plastiden erhebliche Unterschiede in dem Zeitpunkte auftreten können, zu dem Plastidenmutationen sichtbar werden können.

[1] Die zur Zeit viel diskutierte Streitfrage nach der genetischen Bedeutung der Plastidengrana (STRUGGER 1951, 1954, HEITZ-MALY 1953, weitere Literatur bei PERNER 1956) läßt sich nach Meinung des Verfassers nicht durch cyto-morphologische Untersuchungen lösen. Auch bei einer Kontinuität der Grana läßt sich nicht mit völliger Sicherheit beweisen, daß die Grana genetische Elemente sind. Die Tatsache der Plasmakontinuität z. B. genügte allein noch nicht zum Nachweis einer Plasmavererbung. Es ist durchaus denkbar, daß spezifische morphologische Strukturen weitergegeben werden, die Erhaltung und Vermehrung dieser Strukturen aber von Erbträgern gesteuert wird, die räumlich nicht an die Strukturen gebunden sind. Andererseits würde eine Diskontinuität der Grana keineswegs die Möglichkeit ausschließen, daß die Grana Erbeinheiten enthalten oder aus ihnen zusammengesetzt sind. Wir können nicht unbedingt fordern, daß die Plastidengene so groß sind, daß sie im Licht- oder Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden können.

III. Die intraindividuelle Umkombination plasmatischer Erbeinheiten

Ein weiteres Kennzeichen der Plasmavererbung ist, daß die plasmatischen Erbeinheiten schon im Verlauf der vegetativen Zellteilungen, nicht erst am Ende einer Generation umkombiniert werden können. Die Mehrzahl der bisher aufgefundenen Plasma- und Plastidenabänderungen wurde intraindividuell gefunden, sei es als einzelne Zellen oder Zellverbände, sei es als Seitentriebe oder Sports. Diese intraindividuelle Umkombinationsmöglichkeit hat erhebliche methodische Konsequenzen. Die Plasmonabänderungen sind nicht nur unter den Nachkommen der mit mutagenen Agentien behandelten Pflanzen als abgeänderte Individuen zu suchen. Mindestens ebensowichtig ist die Suche nach abgeänderten Zellen, Geweben und Pflanzenteilen. Der Zeitpunkt, zu dem solche Abänderungen erwartet werden können, ist sehr verschieden und hängt von verschiedenen Faktoren, vor allem von der Geschwindigkeit der Umkombination und von der Manifestation der Mutante ab. Erfolgt die Umkombination sehr rasch und manifestiert sich die Mutante schon an einzelnen Zellbestandteilen (z. B. Plastiden), so kann eine Abänderung sehr kurz nach dem eigentlichen Mutationsereignis erwartet werden, z. B. schon längst vor der Bildung der Geschlechtszellen am Ende einer Generation. Erfolgt die Anreicherung der mutierten Einheiten in den Zellen sehr langsam und manifestiert sich die Mutation erst in einzelnen Zellen oder Organen, so kann zwischen dem Mutationsereignis und dem Sichtbarwerden der Mutante ein sehr langer Zeitraum verstreichen, ein Zeitraum, der vielleicht sogar mehrere Generationenfolgen in sich schließen kann. Aber auch nach einem so großen Abstand ist die Möglichkeit gegeben, daß die Mutante nur einzelne Teile eines Individuums umfaßt.

Dieser verschieden große Zeitraum zwischen Mutationsereignis und Erkennung der Mutante erschwert die Analyse des Mutationsvorganges erheblich. Quantitative Aussagen über die Mutationshäufigkeit lassen sich nur dann machen, wenn sich die mutierten Erbträger ebenso vermehren wie die normalen, wenn sie ebenso verteilt werden und wenn es gelingt, die gesamte Deszendenz aller bestrahlten Zellen zu erfassen. Das dürfte meistens nur in bestimmten Sonderfällen zutreffen.

Es muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß ein Teil der mutierten Erbeinheiten oder die abgeänderten Zellen eine andere Vermehrungsrate erhalten. Meistens wird eine Vermehrungsminderung auftreten, die leicht zu einer Elimination der mutierten Einheiten führen kann. Anders als beim Zellkern wird im Zellplasma mit seinen vielen gleichartigen Erbeinheiten der Verlust einzelner mutierter Einheiten ohne Defizienzeffekte ertragen werden. Mutierte Plasmaeinheiten, die die Zellfunktion oder Zellvermehrung stören, können ohne Schwierigkeiten eliminiert werden. Eine solche intracellulare und intraindividuelle

Selektion wird dazu führen, daß die Zahl der aufgefundenen Mutanten geringer ist als die Zahl der stattgefundenen Mutationen. Sie kann weiterhin dazu führen, daß in der Mehrzahl der Fälle Mutanten zur Beobachtung kommen, die einen positiven Selektionswert haben. Besonders Mutanten, die eine erhöhte Vermehrungsrate besitzen, werden viel häufiger gefunden werden, als das ihrem Vorkommen kurz nach der Mutation entspricht.

Weitere Schwierigkeiten für die Auswertung von Mutationsversuchen entstehen durch die entwicklungsgeschichtlichen Vorgänge im Versuchsobjekt. Bei höheren Organismen ist das Wachstum vielfach auf Vegetationspunkte und Wachstumszonen beschränkt. Es gibt nur wenige Gewebe im Objekt (z. B. Blattparenchyme), in denen sich die Mehrzahl aller Zellen über längere Zeit im selben Rhythmus teilt. In der Regel bleibt ein Teil der gebildeten Zellen einer Zelldeszendenz über kurz oder lang ungeteilt liegen oder gelangt in Organe, in denen sich die Mutanten nicht manifestieren können. Bei den Sproßvegetationspunkten gelangt ein Teil der entstandenen Zellen in die Internodien und ins Sproßinnere, relativ wenige in die Blätter. Bei der Embryoentwicklung von *Epilobium* z. B. laufen bis zur ersten Anlage der Keimblätter 7 Zellteilungsfolgen ab. Es sollten rechnerisch 128 Zellen entstehen. Nur 8 von diesen Zellen sind an der Bildung der Keimblätter, nur 4 an der Bildung der Parenchyme des Sprosses beteiligt. Betrachtet man Plastidenmutationen, so entziehen sich diese in 116/128 der von der Eizelle ausgehenden Zelldeszendenzlinien der Beobachtung. Die Häufigkeit der Plastidenmutanten sinkt in entsprechender Weise. Ohne genaue Kenntnis dieser entwicklungsgeschichtlichen Vorgänge lassen sich kaum quantitative Aussagen über die Höhe der Plasmamutationsrate machen.

C. Mutation und Plasma-Umkombination

Eine Plasmamutation wird in der Regel erst sichtbar werden können, wenn in den einzelnen Zellen die mutierten Erbeinheiten durch Umkombination angereichert worden sind. Es müssen daher die wichtigsten *Prinzipien einer Plasma-Umkombination* überlegt und besprochen werden. Dabei sei die Möglichkeit einer selektiven Plasmavermehrung und einer einseitigen Verteilung der Erbeinheiten bei der Zellteilung unberücksichtigt gelassen, sondern nur die Plasma-Umkombination bei gleichmäßiger Vermehrung und zufallsgemäßer Verteilung besprochen. Folgende Überlegungen sprechen dafür, daß dieser Typ der Plasma-Umkombination der ursprüngliche ist, von dem ungleiche Vermehrung und einseitige Verteilung als Sonderfälle abzuleiten sind. Erbträger können nur solche Plasmabestandteile sein, die zum mindesten in der Keimbahn der Organismen dauernd erhalten bleiben. Es muß eine koordinierte

Vermehrung von Zellen und Erbträgern erfolgen, und es muß eine geordnete Verteilung der Erbträger auf die Tochterzellen stattfinden, so nicht diese Plasmabestandteile zum mindesten in einzelnen Zelldeszendenzlinien verlorengehen und damit ihre Erbfunktion einbüßen sollen. Eine solche koordinierte Vermehrung und geordnete Verteilung gehört zum Begriff eines Erbträgers. Der einfachste Fall einer solch koordinierten Vermehrung und geordneten Verteilung ist ein alternierender Teilungsrhythmus von Zellen und Erbträgern und eine gleichmäßige, aber zufallsgemäße Aufteilung der Erbträger auf die Tochterzellen. Ein solcher Mechanismus läßt sich auch für die Plastiden wahrscheinlich machen, nur daß hier während der somatischen Differenzierung mannigfache Abweichungen von der koordinierten Vermehrung vorkommen können.

Wird von zahlreichen, gleichartigen Erbträgern einer Zelle einer durch Mutation abgeändert, so wird die ursprünglich homoplasmonisch normale Zelle heteroplasmonisch, ohne daß diese Heteroplasmonie sichtbar zu werden braucht. Die Mutation muß auf alle Fälle dann sichtbar werden, wenn aus heteroplasmonischen Zellen homoplasmonisch mutierte Zellen entstehen. Das kann frühestens dann der Fall sein, wenn der mutierte Erbträger im Verlauf der Teilungen so vermehrt worden ist, daß die Zahl der mutierten Einheiten die Zahl erreicht, die für den Erbträger in funktions- und teilungstüchtigen Zellen charakteristisch ist. Ist die Zahl der Erbträger je Zelle nach der Zellteilung 1 n, erfolgt nach jeder Teilung der Zellen auch eine Teilung und Vermehrung der Erbträger auf 2 n und wird diese Zahl mit der nächsten Zellteilung wieder auf 1 n reduziert, so werden erst nach mindestens $\sqrt{n}$ Teilungen nach der Mutation homoplasmonisch abgeänderte Zellen auftreten können. Bei zehn Erbträgern je Zelle sind also mindestens 4, bei 50 Erbträgern mindestens 6, bei 1000 Erbträgern je Zelle mindestens 10 Teilungsfolgen der Erbträger und Zellen notwendig. In diesem geringen Abstande von der Mutation können homoplasmonisch abgeänderte Zellen aber nur dann auftreten, wenn die mutierten Erbträger bei den Zellteilungen stets einseitig in eine der Tochterzellen wandern. Werden die Erbträger vor jeder Zellteilung gründlich durchmischt und bei der Zellteilung zufallsgemäß verteilt, so ist die Wahrscheinlichkeit, daß homoplasmonisch mutierte Zellen schon in der oben berechneten Mindestzahl von Zellteilungen entstehen, sehr viel geringer. Bei 5 Erbträgern je Zelle können nach 3 Zellteilungen erstmalig homoplasmonisch abgeänderte Zellen auftreten. Bei einseitiger Verteilung sind dann 8 Zellen entstanden, von denen 1 (= 12,5%) homoplasmonisch abgeändert ist. Bei völlig zufallsgemäßer Verteilung aber entstehen solche Zellen in einer Wahrscheinlichkeit von nur 0,24%. Erst in der nächsten 4. Zellteilung sind homoplasmonisch mutierte Zellen in einer

Wahrscheinlichkeit von 0,9%, in der 5. Zellteilung von 1,9% zu erwarten. Bei 10 Erbträgern können erstmalig nach 4 Zellteilungen bei einseitiger Verteilung 6,25% homoplasmonisch mutierte Zellen auftreten. Ihre Wahrscheinlichkeit sinkt bei zufälliger Umkombination auf 0,0001% und hat erst nach 15 Zellteilungsfolgen den Wert von 1,32% erreicht. Bei 25 Erbträgern sind die entsprechenden Werte nach 5 Zellteilungen 3,125% und $1 \cdot 10^{-16}$%. Nach 35 Zellteilungen können homoplasmonisch mutierte Zellen erst in einer Häufigkeit von 0,22% erwartet werden. Bei 50 Erbträgern je Zelle können nach 6 Teilungen der Erbträger und Zellen bei einseitiger Verteilung noch 1,6% homoplasmonisch mutierte Zellen auftreten, bei zufallsgemäßer Umkombination können sie praktisch in dieser und den nächsten Zellteilungsfolgen nicht mehr vorkommen. Erfolgt die Umkombination nicht völlig zufallsgemäß, sondern ist die Durchmischung der Erbträger zwischen 2 Zellteilungen nicht vollständig oder ist die Verteilung schwach einseitig, so sind homoplasmonisch mutierte Zellen in einer Häufigkeit zu erwarten, die zwischen den angegebenen Grenzwerten liegt[1].

Diese Überlegungen zeigen, daß sich an eine Mutation plasmatischer Erbträger in den meisten Fällen eine Phase der latenten Umkombination und Entmischung anschließt, die bei einseitiger Verteilung nur sehr kurz sein kann, bei zufallsgemäßer Umkombination sich aber mit steigender Zahl der Erbträger je Zelle sehr rasch verlängert (weitere Zahlen bei MICHAELIS 1955a, b, 1957b).

Vom Zeitpunkt des ersten Auftretens homoplasmonisch mutierter Zellen nimmt die Zahl der abgeänderten Zellen dauernd zu. Die Zunahme entsteht teils durch Vermehrung der abgeänderten Zellen, teils dadurch, daß aus den heteroplasmonischen Zelldeszendenzen immer wieder homoplasmonische Zellen abgegeben werden. Gleichzeitig nimmt der prozentuale Anteil der heteroplasmonischen Zellen wieder kontinuierlich ab (Abb. 1). Dadurch nimmt die Zahl der neu aus den heteroplasmonischen Zellen entstehenden homoplasmonisch mutierten Zellen zuerst bis zu einem Höhepunkt der Entmischungen zu und dann wieder ab. In diese Periode der Zunahme homoplasmonisch mutierter Zellen fällt das erste Sichtbarwerden der Mutante, wobei dieser Zeitpunkt im einzelnen von manchen Faktoren, z. B. von der Genauigkeit der Beobachtung, von der Manifestation der Mutation und von der Entwicklungsgeschichte des Objektes abhängig ist.

[1] Zur Beurteilung dieser Zahlen sei kurz mitgeteilt, daß bei *Epilobium* während der Embryoentwicklung 7 Zellteilungsfolgen, in der Entwicklung einer Blattlamina rund 15 Zellteilungsfolgen ablaufen. Wieviel Zellteilungsfolgen zum Aufbau einer blühenden Pflanze benötigt werden, ist zur Zeit noch unbekannt. Bei den einzelnen Versuchsobjekten dürften die entsprechenden Werte beträchtlichen Schwankungen unterworfen sein.

Im Laufe der weiteren Zellteilungen werden die Entmischungen mit Abnahme der Zahl der heteroplasmonischen Zellen wieder seltener, bis schließlich alle heteroplasmonischen Zelldeszendenzen völlig entmischt sind. Die Entmischungen sind zu einem Zeitpunkt abgeschlossen, der

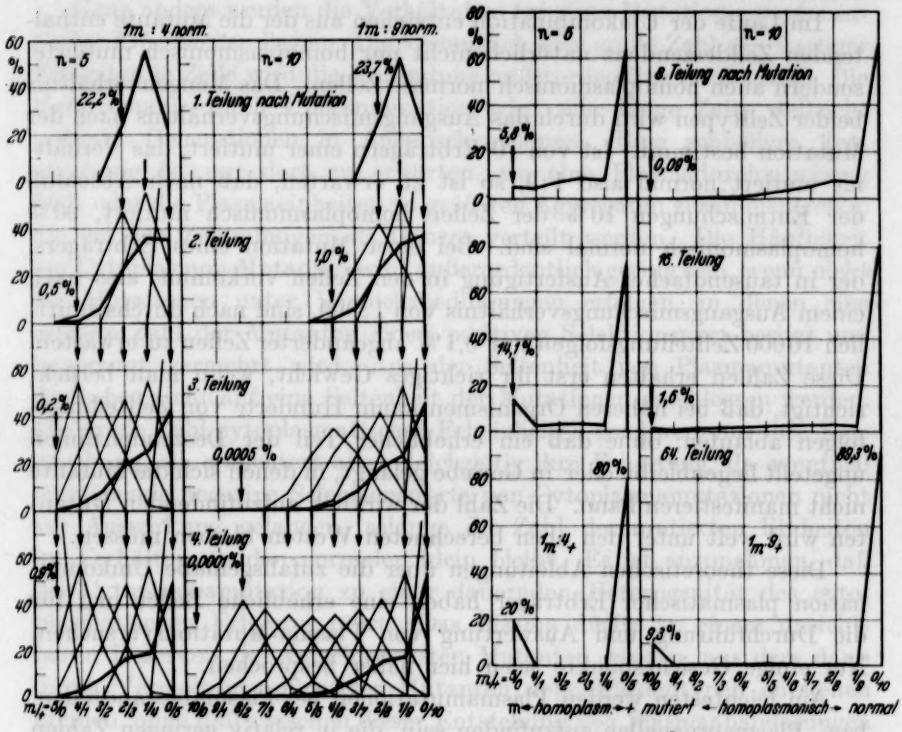


Abb. 1a u. b. Theoretische Kurven der Plasma-Umkombination nach Mutation. In der linken Kurvenreihe sind n = 5 Erbträger je Zelle angenommen, die sich vor der Zellteilung auf 2 n = 10 verdoppeln, um mit der Zellteilung wieder auf n = 5 halbiert zu werden. Mit der Mutation entsteht das Mischungsverhältnis n = 1 mutiert : 4 normale Erbträger. Auf der Abszisse sind die theoretisch möglichen Mischungsverhältnisse in der Zelle angegeben: 5/0 homoplasmonisch normale, 4/1—1/4 heteroplasmonische, 0/5 homoplasmonisch mutierte Zellen. Auf der Ordinate ist angegeben, in welcher Häufigkeit die einzelnen Mischungsverhältnisse nach den Zellteilungen zu erwarten sind. In der rechten Kurvenreihe sind die entsprechenden Werte für n = 10, 2 n = 20 Erbträger je Zelle angegeben. In a sind die Werte angegeben, die nach der 1.—4. Zellteilungsfolge zu erwarten sind. Die dick gezeichnete Kurve gibt die Mischungswahrscheinlichkeiten wieder, die in der gesamten Zelldeszendenz zu erwarten sind, die dünn gezeichneten Kurven geben die Werte der Teildeszendenzen wieder, die nach Teilung von Zellen mit ganz bestimmtem Mischungsverhältnis zu erwarten sind. In b sind nur die Gesamtwerte nach der 8., 16. und 64. Zellteilung wiedergegeben

von der Zahl der Erbträger je Zelle abhängig ist und sich der Größenordnung nach bei größeren n-Werten durch die Formel 10 n abschätzen läßt. Bei 10 Erbträgern je Zelle sind nach durchschnittlich 100 Zellteilungen keine heteroplasmonischen Zellen mehr zu erwarten, bei

1000 Erbträgern je Zelle dürften die Entmischungen nach rund 10000 Zellteilungsfolgen abgeschlossen sein. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß diese abgeschätzten Werte Werte der durchschnittlichen Erwartung sind, die in einzelnen Zelldeszendenzen über- und unterschritten werden können.

Im Laufe der Umkombination entstehen aus der die Mutante enthaltenden Zelldeszendenz natürlich nicht nur homoplasmonisch mutierte, sondern auch homoplasmonisch normale Zellen. Das Mengenverhältnis beider Zelltypen wird durch das Ausgangsmischungsverhältnis nach der Mutation bestimmt. Ist von 10 Erbträgern einer mutiert, das Verhältnis mutiert:normal also 1:9, so ist zu erwarten, daß nach Abschluß der Entmischungen 10% der Zellen homoplasmonisch mutiert, 90% homoplasmonisch normal sind. Bei einer Mutation eines Erbträgers, der in tausendfacher Ausfertigung in den Zellen vorkommt, also nach einem Ausgangsmischungsverhältnis von 1:999, sind nach durchschnittlich 10000 Zellteilungsfolgen nur 0,1% abgeänderter Zellen zu erwarten. Diese Zahlen erhalten erst ihr richtiges Gewicht, wenn man berücksichtigt, daß bei höheren Organismen kaum Hunderte von Zellteilungsfolgen ablaufen, ohne daß ein erheblicher Teil der Deszendenzlinien ungeteilt liegenbleibt oder in Gewebe gelangt, in denen sich die Mutante nicht manifestieren kann. Die Zahl der wirklich aufzufindenden Mutanten wird weit unter den oben berechneten Werten bleiben müssen.

Diese theoretischen Ableitungen über die zufallsgemäße Umkombination plasmatischer Erbträger haben eine erhebliche Bedeutung für die Durchführung und Auswertung von Plasma-Mutationsversuchen. Nur einige Gesichtspunkte seien hier näher besprochen.

Am leichtesten werden Plasmamutationen bei Plasmabestandteilen, bzw. Plasmaorganellen aufzufinden sein, die in relativ geringen Zahlen je Zelle vorkommen und die zumindest in gewissen Entwicklungsstadien für die wichtigsten Erbeinheiten monogen sind. Hierher dürften vermutlich die pflanzlichen *Plastiden* und andere Organellen zu rechnen sein. Mit dieser Überlegung stimmt überein, daß wenigstens spontane Plastidenmutationen vielfach aufgefunden wurden. Die Umkombination und Entmischung abgeänderter Plastiden wird verhältnismäßig schnell erfolgen. Heteroplastidische Zellen werden daher nur während einer relativ begrenzten Zeitspanne aufzufinden sein, nach der dann die Zellen wieder homoplastidisch sind. Mit der begrenzten Zahl der Plastiden je Zelle hängt es wohl zusammen, daß die Plastiden einer Zelle normalerweise alle denselben Plastotyp aufweisen, wenn nicht gerade vor kurzer Zeit eine der seltenen Plastidenmutationen erfolgte. Komplikationen können entstehen, wenn Plastidenmutationen in polygenen Entwicklungsstadien vorkommen (s. Abschnitt B II) oder wenn die abgeänderten Plastiden eine verringerte Vermehrungsfähigkeit oder eine einseitige Verteilung bei

der Zellteilung aufweisen. Im letzteren Falle wird eine Plastidenmutation sehr schnell homoplasmonisch werden können. Es treten dann ohne längere Umkombinationsvorgänge sehr schnell einheitlich abgeänderte Zelldeszendenzen auf, die von einer Mutation von Kerngenen nurmehr durch den nicht mendelnden Erbgang zu unterscheiden sind.

Ganz anders werden die Verhältnisse bei einer Mutation *cytoplasmatischer Erbeinheiten* liegen. Die vermutlich sehr große Zahl gleichartiger Einheiten je Zelle wird die Auffindung außerordentlich erschweren. Die Entmischung durch Umkombination wird sehr lange Zeit, vielleicht mehrere Generationen in Anspruch nehmen. Eine schnellere Entmischung ist nur dort zu erwarten, wo eine Plasmadurchmischung fehlt oder die Plasmaeinheiten zu größeren Aggregaten zusammentreten, die bei den Zellteilungen als Ganzes verteilt werden. Die Häufigkeit der Cytoplasmon-Mutanten wird außerordentlich gering sein, wenn nicht die Mutationen unter Versuchsbedingungen erfolgen, in denen eine größere Zahl der Mutanten einen positiven Selektionswert besitzt und bevorzugt vermehrt wird. Aus der Seltenheit von Plasmamutanten darf aber nicht auf eine Seltenheit der Mutationen geschlossen werden. Die große Zahl cytoplasmatischer Erbeinheiten erschwert nur ihre Entmischung, sie erleichtert aber gleichzeitig ihre Erhaltung, da eventuell entstehende negative Selektionswerte von Cytoplasmamutationen nicht zur Auswirkung gelangen, solange die Zahl der mutierten Einheiten im Verhältnis zu den normalen klein bleibt. Es ist anzunehmen, daß die Cytoplasmamutation zu einer dauernden Heterogenität des cytoplasmatischen Erbgutes führt. Das Plasma dürfte zu einem unsichtbaren Reservoir der verschiedensten Mutanten werden, aus dem dann durch Vermehrung günstiger Mutanten neue Plasmotypen entstehen können, ohne daß zwischen dieser Entstehung von Plasmaabänderungen und der Mutation der Plasmaeinheiten ein direkter Zusammenhang mehr festzustellen wäre.

Bei der Ausführung von Mutationsversuchen ist zu berücksichtigen, daß die Mutanten verschiedener Plasmakonstituenten zu ganz verschiedenen Zeiten in Erscheinung treten können. Objekte mit einer langen Lebensdauer oder eine starke vegetative Vermehrung werden daher die Auffindung von Plasmamutanten erleichtern, während Objekte mit wenig Zellteilungsfolgen weniger geeignet erscheinen, solange wir eventuelle Komplikationen durch die Befruchtungsvorgänge nicht überblicken können. Ebenso sind die Beziehungen zur Entwicklungsgeschichte des Objektes zu beachten. Am geeignetsten erscheinen Versuchsobjekte, bei denen sich möglichst alle Zellen im gleichen Rhythmus teilen und in einem leicht übersehbaren Zusammenhang bleiben. Weniger geeignet erscheinen Objekte mit Meristemen, bei denen die Teilungsfähigkeit auf wenige Zellen beschränkt ist und die übrigen Zellen ihre

Teilung einstellen, bevor es zu einer Manifestation der Mutanten kommt. Will man auf Versuche an höheren Pflanzen nicht ganz verzichten, so gilt es, eine genaue Kenntnis der Entwicklungsgeschichte zu gewinnen und nach Möglichkeit Entwicklungsstadien auszuwählen, die die günstigsten Bedingungen aufweisen.

Die meisten Mutanten werden bei Mutationsversuchen an höheren Pflanzen intraindividuell auftreten und an einer Fleckung und *Musterung* des Objektes zu erkennen sein. Bei einem einfachen Mutationsvorgang entsteht auch nur ein einfaches Muster, ein einzelner Fleck oder Sektor. Schließt sich an den Mutationsvorgang eine Umkombination an, so entsteht ein wesentlich komplizierteres Muster, durch dessen Analyse die einzelnen Umkombinationsschritte rekonstruiert werden können. Die Analyse der Mutantenmuster ist daher für die Deutung der Mutante ebenso wichtig wie der Kreuzungsversuch. Es lassen sich durch Musteranalyse ohne weiteres bestimmte Abänderungstypen festlegen, so nur das Muster genügend umfangreich ist und in Geweben liegt, die der Beobachtung gut zugänglich sind. Im folgenden seien einige Kennzeichen von Mustern erwähnt, die nach den theoretischen Überlegungen und den experimentellen Erfahrungen für eine zufallsgemäße Umkombination plasmatischer Erbträger charakteristisch sind:

1. Genetisch bestimmte Muster, gleichgültig, ob sie auf eine Kern- oder Plasmamutation zurückzuführen sind, müssen in allen Einzelheiten mit den Zellteilungsvorgängen übereinstimmen, die zum Aufbau des gemusterten Organs führen. Die Mustergrenzen fallen mit den Grenzen der abgeänderten Zelldeszendenzen zusammen. Es ist dies ein wichtiges Kennzeichen zur Unterscheidung von umweltbedingten Mustern, wie sie durch Verwundungen, Infektionen oder physiologische Gradienten entstehen.

2. Ein wesentliches Zeichen einer Musterung durch zufallsgemäße Plasmaentmischung ist, daß sie den Phasenablauf der Plasma-Umkombination wiederspiegelt. Dabei können die einzelnen Phasen auf ganz verschiedene Organe, z. B. auf Blätter verschiedener Stellung verteilt werden. Es ist notwendig, nicht ein einzelnes gemustertes Blatt, sondern den ganzen Umkombinationsvorgang zu erfassen. Während der latenten Phase der Entmischung entstehen in der Zelldeszendenz der durch Mutation heteroplasmonisch gewordenen Zelle neben homoplasmonisch normalen zahlreiche heteroplasmonische Teildeszendenzen. Wenn von diesen heteroplasmonischen Deszendenzen genügend große homoplasmonisch mutierte Tochterdeszendenzen abgegeben worden sind, wird die Musterung sichtbar. An einem bestimmten Sektor des Objektes entstehen zahlreiche kleinste, einander ähnliche Flecken. Mit fortschreitender Entmischung wird die Fleckung des Sektors (meistens auf jüngeren Blättern) gröber, wobei neben großen Flecken stets auch ganz

feine Flecken auftreten. In dem Ausmaße, in dem sich die Entmischungsphase ihrem Ende nähert, werden die kleinen Flecken (Neuentmischungen aus heteroplasmonischen Zellen) seltener, das Areal der größeren Flecken (ältere homoplasmonische Zelldeszendenzen) nimmt zu. Mit Abschluß der Entmischungen nimmt zwar die Größe der homoplasmonisch mutierten Areale zu, es entstehen aber keine neuen abgeänderten Zelldeszendenzen mehr. Dieser phasische Ablauf der Musterung weist infolge der zufallsgemäßen Umkombination und durch die Stillegung zufälliger Teildeszendenzen im Soma eine erhebliche Streuung auf. In seiner Gesamtheit ist der Ablauf an größeren Mustern aber so kennzeichnend, daß eine plasmatisch bedingte Scheckung kaum mit anderen Musterungen verwechselt werden kann.

3. Ein weiteres Kennzeichen einer plasmatischen Umkombination ist die Verschachtelung der Muster (Abb. 2). Das Muster z. B. einer durch Plastidenentmischung entstandenen *albomaculatum*-Schecke läßt sich in zahlreiche Teilmuster mit sehr verschiedener Fleckenzahl und Fleckengröße auftrennen. Die Anordnung und Grenzen dieser Teilmuster sind durch die Entwicklungsgeschichte, Fleckenzahl und Fleckengröße durch den Ablauf der Plasmaentmischung bestimmt. Da die zur Verschachtelung führenden Vorgänge kompliziert sind, seien sie an Hand eines Beispieles etwas näher besprochen.

In Abb. 2a ganz rechts ist ein Blatt abgebildet, das aus einem einen großen Teil der Pflanze 1955 · 4265 · 74 umfassenden gescheckten Sektor stammt. Dieser Sektor ist von der Zelldeszendenz der Zelle gebildet, in der in der Keimpflanze die Mutation erfolgte. In diesen Sektor sind die Teildeszendenzen „eingeschachtelt", die mit jeder Teilung der Zellen neu abgegliedert wurden. Das abgebildete Blatt enthält 4 solcher Teildeszendenzen (1. Einschachtelung), 3 davon (linkes Blattöhrchen, rechte Blatthälfte + Öhrchen) sind schon homoplasmonisch grün geworden. In dem Muster der linken Blatthälfte läßt sich ein oberer Teil mit wenigen unregelmäßigen Flecken unterscheiden und ein unterer Teil (2. Einschachtelung), der ungefähr 4 Längsbinden trägt. Von diesen Längsbinden (3. Einschachtelung) des unteren Blatteiles sind einzelne rein weiß, einzelne gescheckt. Jede der gescheckten Binden läßt sich in mindestens 2 Teile (4. Einschachtelung) gliedern, die teils grün, teils locker, teils fein gescheckt sind. Untersucht man grüne Flecken besonders der fein gescheckten Areale mikroskopisch, so findet man in ihnen wieder eine Anzahl kleinster, farbloser Zellgruppen (5. Einschachtelung, Abb. 2b). Jedes dieser scharf umschriebenen, charakteristisch gefleckten Teilareale enthält eine Zelldeszendenz, die in das Areal einer früher entstandenen Zelldeszendenz eingeschlossen ist und selbst wieder in verschieden gefleckte Tochterdeszendenzen zerfallen kann. Die Fleckendichte eines Areales wird durch die Entmischungshäufigkeit der entsprechenden Zelldeszendenz bestimmt, die Fleckengröße durch den Zeitpunkt der Entmischungen.

Diese Verschachtelung beruht auf folgenden Gesetzmäßigkeiten der Plasmonumkombination: Ist in einer Zelle ein bestimmtes Ausgangsmischungsverhältnis mutierter (m) und normaler (+) Erbträger vorhanden, z. B. das Verhältnis 2 n = 4 m : 16 +, so sind nach der Teilung in den Tochterzellen nicht alle theoretisch möglichen Zahlenverhältnisse gleich häufig. Nach zufallsgemäßer Verteilung tritt

Abb. 2a. Vier Epilobium-hirsutum-Blätter mit verschachtelter Blattmusterung, wie sie im Gefolge einer zufallsgemäßen Plasmon-Umkombination auftritt. Näheres Text

am häufigsten in den Tochterzellen wieder dasselbe Mischungsverhältnis auf wie in der Mutterzelle, also n = 2 m:8 +, bzw. 2 n = 4 m:16 +. Kleine Abweichungen vom Ausgangsmischungsverhältnis nach der einen oder anderen Seite sind schon etwas seltener, z. B. die Abweichung ± 1 auf n = 1 m:9 + (2 n = 2 m zu 18 +) und n = 3 m:7 + (2 n = 6 m:14 +). Sehr selten sind große Abweichungen vom Ausgangsmischungsverhältnis wie z. B. n = 0 m:10 + (2 n = 0 m zu 20 +) und n = 4 m:6 + (2 n = 8 m:12 +). Die genaue theoretisch errechnete Häufigkeit kann aus den Kurven der Teildeszendenzen in Abb. 1 entnommen werden.

Überträgt man diese Gesetzmäßigkeiten auf eine längere Zelldeszendenz, so wird darin ein einmal gegebenes Mischungsverhältnis meistens über eine Reihe

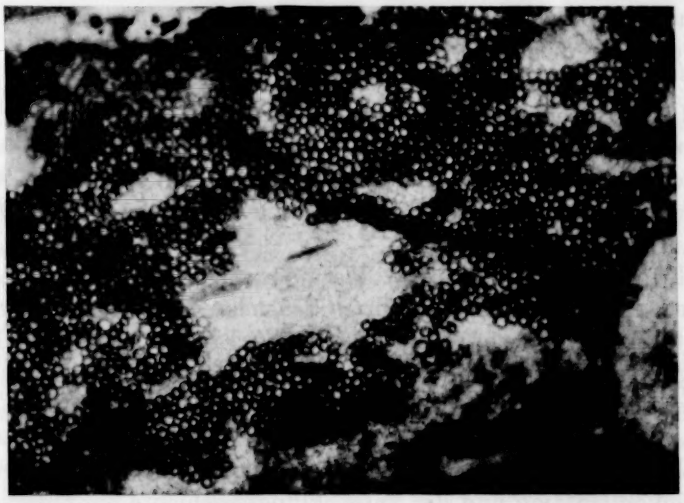


Abb. 2b. Entsprechendes mikroskopisches Muster aus dem Palisadenparenchym eines gescheckten Epilobium-Blattes

von Zellteilungsfolgen festgehalten. Gelegentlich kommt aber immer wieder eine größere Abweichung von dem ursprünglichen Mischungsverhältnis zustande, die dann wieder über eine längere Reihe von Zellteilungsfolgen bewahrt wird. Auf diese Weise entstehen eine ganze Anzahl von Zelldeszendenzlinien, die im Laufe der Plasma-Umkombination ganz verschiedene Entmischungswahrscheinlichkeiten erhalten und schließlich charakteristische Entmischungsmuster geben. Aus dem fünffach verschachtelten Muster des oben besprochenen Blattes läßt sich entnehmen, daß bei der Umkombination im Verlaufe der 15—20 in der Blattlamina ablaufenden Zellteilungen mindestens fünfmal ein größerer Umkombinationssprung erfolgt ist, während sich in den übrigen Zellteilungen das Mischungsverhältnis nur unwesentlich verändert hat.

Die Musterung kann nicht nur durch Zufälligkeiten der Umkombination und durch die Anordnung der einzelnen Zellteilungsebenen (vgl. z. B. dikotyle und monokotyle Blätter) in mannigfacher Weise abgewandelt werden, je nach der Zahl der umkombinierten Einheiten je Zelle können die durch Plasmonumkombination entstehenden Muster sehr verschieden aussehen. Am besten ist die Verschachtelung zu erkennen, wenn die Zahl der Erbeinheiten je Zelle ungefähr zwischen

10 und einigen Hundert liegt. Bei der sehr schnellen Umkombination einer geringeren Anzahl von Erbeinheiten muß die Verschachtelung gering sein und ist dann schwer zu erkennen. Bei einer sehr großen Zahl von Erbeinheiten benötigt die Entmischung zuviel Zellteilungsfolgen, die Mustergrenzen werden unscharf, und die Muster sind kaum mehr zu überblicken. Es kann zu einer ± kontinuierlichen, wenn auch zufälligen Verschiebung der Wirkungseffekte kommen.

Ganz allgemein sind die durch zufallsgemäße Plasma-Umkombination entstehenden, verschachtelten Muster so charakteristisch, daß sie kaum mit Mustern verwechselt werden können, die durch somatische Kernmutation oder durch physiologische Einwirkungen entstehen. Es erscheint daher möglich, die verschachtelten Muster zur Identifizierung einer Plasmavererbung zu verwenden. Es wird in Abschnitt B von MICHAELIS (1958c) noch zu besprechen sein, daß alle bisher aufgefundenen Fälle, die auf Grund der Musterung einer Plasmavererbung zugesprochen wurden, nach Kreuzung auch einen mütterlichen Erbgang aufwiesen.

4. Erfolgt eine Mutation in Plasmaorganellen, z. B. in Plastiden, und sind die durch die Mutation entstehenden Unterschiede der Organellen allein von dem in jedem einzelnen Organell lokalisierten Erbgut abhängig, so müssen während der Umkombinationsphase Zellen nachzuweisen sein, die beide Organelltypen nebeneinander enthalten (Mischzellen). Auch die intracellulären und intercellulären Muster müssen wie die makroskopisch sichtbaren Muster den Gesetzmäßigkeiten der Plasmon-Umkombination und der Entwicklungsgeschichte der untersuchten Gewebe entsprechen. Durch mikroskopische Untersuchung der Muster können Scheckungen mit echten Plastiden-Mischzellen mit Sicherheit einer Plastidenvererbung zugeordnet werden (MICHAELIS 1957a). Im übrigen wird auf das Problem der Plastiden-Mischzellen an anderer Stelle einzugehen sein.

D. Vorversuche (1947—1952)

Die Versuche sollten nicht nur Beiträge zur Mutabilität der plasmatischen Erbträger liefern, sondern es sollte gleichzeitig versucht werden, die an dem *Epilobium-hirsutum* ♀ × *parviflorum* ♂-Bastard spontan auftretenden Plasma-Umkombinationen willkürlich zu induzieren und die durch diese Umkombination entstehende Abänderungsrate zu verändern. Weiterhin sollte eine größere Anzahl von Kernmutanten erzeugt werden, deren Manifestation in verschiedenen Erbplasmen untersucht werden sollte (MICHAELIS 1958b). Aus diesen Gründen wurden in die vorläufigen Behandlungsversuche folgende Pflanzen einbezogen: *Epilobium hirsutum*, Sippe Essen (vereinzelt auch *Ep. hirsutum*, Sippe Jena), *Ep. parviflorum*, Sippe Tübingen, *Epilobium-hirsutum* ♀ × *parviflorum* ♂-Bastarde und einige aus diesem Bastard entstandenen Plasmon-Neukombinationen, die selbst wieder verhältnismäßig häufig abändern, vor allem die Abänderung *irregulare*. Die endgültigen Versuche wurden auf *Epilobium hirsutum*, Sippe Essen, beschränkt.

Pflanzenmaterial. Die beiden Arten: *hirsutum* und *parviflorum* erhielt ich mit dem Sortiment von BRÜCHER, der sie seinerseits den Kulturen von LEHMANN entnommen hatte. Sie sind dort über viele Jahre geselbstet worden. Ich selbst verwendete, wie bei anderen Kreuzungen, stets vegetativ vermehrte Klone beider Arten zur Herstellung der Bastarde. Für die Mutationsversuche an den Arten wurden zum Teil ebenfalls Klonpflanzen, teils Samen aus Selbstungen dieser Klone verwendet. Bei *Ep. hirsutum* Essen ließ sich durch ausgedehnte Selektionsreihen keinerlei Heterozygotie nachweisen. Über eine latente, nur in den gehemmten *hirsutum* ♀ × *parviflorum* ♂-Bastarden erkennbare Heterozygotie der *Ep.-parviflorum*-Sippe Tübingen wird an anderer Stelle zu berichten sein. Für die hier beschriebenen Mutationsversuche ist sie als Konstante ohne größere Bedeutung, da in allen Jahren mit demselben Klon gearbeitet wurde.

Bei allen Versuchen zur Plasmamutation ist damit zu rechnen, daß sich an die eigentliche Mutation der plasmatischen Erbeinheiten eine Umkombination dieser Einheiten anschließen muß, damit die Mutante sichtbar werden kann. Diese Umkombination erfolgt schon intraindividuell und ist damit in hohem Ausmaße von den entwicklungsgeschichtlichen Vorgängen in der Pflanze abhängig. Die Bestrahlung ist daher so durchzuführen, daß möglichst viele Zelldeszendenzlinien der bestrahlten Zellen zur Entwicklung kommen und Gewebe ausbilden, in denen sich die Mutanten manifestieren können. Da zur Zeit der Vorversuche ein Überblick über die Umkombinationsvorgänge und über die genaue Entwicklungsgeschichte fehlte, wurden die Behandlungen in sehr verschiedenen Entwicklungsphasen der Pflanzen durchgeführt. So wurden z. B. in den Bestrahlungsversuchen keimende Samen, Keimlingsrosetten, vegetative Sprosse, Sprosse zum Zeitpunkte der Blütenanlage, Blütenstände und Fruchtknoten mit reifenden Embryonen bestrahlt, beim *Ep.-hirsutum* ♀ × *parviflorum* ♂-Bastard auch überwinternde Rosetten zum Zeitpunkt der Entstehung der spontanen Plasmon-Umkombinationen. Die behandelten Blüten wurden teils zu Selbstungen, teils zur Herstellung plasmagestörter Bastarde (*hirsutum* × *parviflorum* und andere) verwendet. Nach Behandlung vegetativer Organe wurden möglichst viele Seitensprosse durch Zerlegen der Pflanze in ihre einzelnen Knoten und Stecklingsbildung zum Austreiben gezwungen.

Es wurden folgende *Behandlungen* durchgeführt:

a) Die Pflanzen wurden unter verschiedenen *Temperaturen* und Lichtverhältnissen aufgezogen und vor allem Schocks durch Kälte und subletal hohen Temperaturen ausgesetzt. Es gelang, die Plasmon-Umkombinationrate des *Ep.-hirsutum* ♀ × *parviflorum* ♂-Bastardes wesentlich zu beeinflussen (MICHAELIS 1954c). Abänderungen, die als Plasmon-Mutationen hätten gedeutet werden können, wurden nicht gefunden.

b) Es wurden mannigfache Behandlungen mit *chemischen Substanzen* durchgeführt, die entweder als mutagene oder carcinogene Agentien bekannt waren, die in charakteristischer Weise in die physiologischen Zustände der Zellen eingreifen oder die selektiv in bestimmten Zellbestandteilen angereichert werden und vermutlich deren Vermehrungsrate verändern. Die Behandlung wurde auf verschiedene Weise durchgeführt: Besprühungen, Einbringen von getränkten Wattebäuschchen in die Sproßknospen, Aufsteigen in den Leitbahnen, Vakuum-Infiltration, Samenkeimung in den Lösungen. Lipophile Substanzen wurden in Lanolin-, bzw. Vaselinpasten aufgetragen oder in Öl gelöst. Bei leicht verdampfenden Stoffen wurden die Pflanzen über längere Zeit unter gasgefüllten Glasglocken kultiviert. Trotz dieser verschiedenartigen Applikationen bleibt es problematisch, inwieweit die Stoffe wirklich an die meristematischen Zellen der Vegetationspunkte und nicht nur in das somatische Gewebe gelangten. Von jedem Stoff wurde zuerst die letale

Konzentration bestimmt und eine Konzentrationsreihe verwendet, die von unwirksamen bis zu subletalen Bereichen führte. Notgedrungenerweise mußte in diesen Tastversuchen die Zahl der behandelten Pflanzen in den Einzelversuchen klein (20—200) bleiben, so daß nur auffälligere Effekte zur Beobachtung kommen konnten.

Eindeutige Plasmamutationen wurden in den Versuchen nicht gefunden, so daß sich ein näheres Eingehen auf die Versuche erübrigt. Die verwendeten Substanzen sind an anderer Stelle (MICHAELIS 1954a) kurz aufgeführt. Es sei nur kurz erwähnt, daß in den *Streptomycin*-Versuchen die Pflanzen kein Chlorophyll bilden konnten. Nach Abbruch der Versuche wurden neu zuwachsende Pflanzenteile grün. Eine Übertragung von Chlorophyll-Defekten auf die Nachkommen konnte nicht festgestellt werden. In den Versuchen mit den carcinogenen Agentien *Benzpyren* und *Methylcholanthren* traten extrem gestauchte Sprosse mit dachziegelartig liegenden Blättern auf, die sich aber als Stecklinge normal weiterentwickelten. Ihre Nachkommenschaft war im Gegensatz zu den Versuchen von NOTHDURFT (1948) und WEYLAND (1948) normal. Bei Behandlung mit *Formaldehyd-* und *Säure*dämpfen (Salzsäure, Eisessig) schien die Rate der Plasmonabänderungen des *Ep.-hirsutum* ♀ × *parviflorum* ♂-Bastardes zu Gunsten einiger besonders schmalblättriger Plasmotypen verändert. Es war jedoch die durch die Versuchsanstellung begrenzte Zahl der behandelten Pflanzen zu klein, um die Unterschiede statistisch zu sichern. Schließlich sei noch besonders betont, daß in keinem Falle eine Erhöhung der *Resistenz* festgestellt wurde. An den Stecklingen und Nachkommen der behandelten Pflanzen wurden nach Abbruch der Behandlung in mehreren Zeitabständen die Gift-, Temperatur- und Strahlenresistenz geprüft. Wenn überhaupt Veränderungen der Resistenz auftreten, so können sie nur selten und geringfügig sein.

c) In den *Bestrahlungsversuchen*[1] wurden die Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien mit 3000—15000 r bestrahlt, es wurden Keimpflanzen während 3 Wochen einer täglichen Bestrahlung von 1000 r ausgesetzt und während 2 Wochen unter der Dauerbestrahlung eines Mesothorium-Präparates aufgezogen (je nach Entfernung von der Strahlungsquelle einer Gesamtbestrahlung von 500—50000 r entsprechend). Nachdem die Behandlung mit den radioaktiven Isotopen des Schwefels und Phosphors die besten Ergebnisse zeitigte, wurden die weiteren Versuche auf diese Behandlung konzentriert.

Nach Bestrahlung der keimenden Samen mit mittleren Röntgenstrahlendosen war bei Kultur im Schatten eine deutliche Keimungsbeschleunigung festzustellen. In Rosettenbestrahlungen erfolgte mit steigender Dosis eine Chlorophyllzerstörung, wenn die Pflanzen nach der Bestrahlung in vollem Licht kultiviert wurden. Gleichzeitig kam es zu einer starken Anthocyanbildung, die aber auffallenderweise in Wegfall kam, sowie die Pflanzen aus der vegetativen Phase in die Blühphase eintraten. Blütenprimordien, die zur Zeit der Bestrahlung gerade Kelch- und Kronblätter anlegten, wurden in Seitensprosse umgewandelt, bzw. es kam zu Blütenvergrünungen. Bei Bestrahlungen in späteren Stadien der Blütenentwicklung kam es nurmehr zu einer Sistierung der Entwicklung oder zu einer Fertilitätsminderung.

Physiologische oder plasmatische Schädigung der Geschlechtszellen ließ sich leicht von mutativ bedingten Schädigungen unterscheiden. Im ersteren Falle sind die geschädigten Pollenkörner beliebig auf die Pollentetraden verteilt. Bei Kernmutanten, die sich in der Haplophase manifestieren, sind stets 2 Pollenkörner der Tetrade abgeändert, bzw. es bleibt die Hälfte der Samenanlagen unentwickelt.

[1] Die Bestrahlungen wurden in der Abteilung für Mutationsforschung unseres Institutes durchgeführt, und ich danke Herrn Prof. KAPLAN herzlich für seine Hilfe.

Da bei beiden *Epilobium*-Arten die Pollenkörner im Tetradenverband bleiben und die Samenanlagen in Reihen angeordnet sind, lassen sich solche Kernmutanten ohne Mühe feststellen. Es wurden zahlreiche Mutanten gefunden, die gleichzeitig die Hälfte der Pollenkörner und der Samenanlagen zum Absterben brachten, und Mutanten, die sich entweder nur im Pollen oder nur in den Eizellen manifestierten. Auf die Wiedergabe der Protokolle sei hier verzichtet. Bei der Auszählung der Kernmutanten (Tabelle 3) sind solche Sterilitäts-Mutanten der behandelten Pflanzen nicht berücksichtigt.

Blattanlagen, die in den ersten Entwicklungsstadien bestrahlt wurden, zeigen grobe Entwicklungsstörungen durch Gewebeausfälle, Flecken und Sektoren, die mit zunehmender Größe der Blätter zur Zeit der Bestrahlung an Größe abnehmen. Die Mehrzahl der Flecken und Defekte dürfte durch chromosomale Störungen bedingt sein. Ohne eine eingehende cytologische Untersuchung läßt sich nicht feststellen, ob an der Fleckenbildung auch Plasmamutationen beteiligt sein können. Plastidenscheckungen, die denen der albomaculaten Pflanzen entsprechen, fehlten völlig.

Abweicher, die im Verlaufe der Stecklingsvermehrung entstanden, waren fast alle völlig steril, so daß eine genetische Untersuchung unterbleiben mußte. Wahrscheinlich dürfte es sich in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls um chromosomale Störungen handeln. An einer Rosettenbestrahlung der *Ep.-hirsutum*-Sippe Jena traten an 6 von 19 bestrahlten Pflanzen an einzelnen Stecklingen Blütenstände auf, an denen alle Blüten verschmälerte, bläulich verfärbte und stark faltig runzelige Kronblätter besaßen. Sämtliche Kreuzungs- und Selbstungsnachkommen der abnormen Stecklinge besaßen normale Blüten, wie auch die Stecklinge selbst im nächsten Jahre normale Blüten bildeten. Die genetische Deutung der Abänderung muß völlig offen bleiben.

Kernmutanten, die unter den Nachkommen der bestrahlten Pflanzen gefunden wurden, wurden in das Mutationssortiment eingereiht. Über sie ist berichtet worden, soweit sie für die Probleme der Plasmavererbung von Interesse sind (Michaelis 1958b). Abänderungen, die mit Sicherheit als Plasmonmutanten hätten angesprochen werden können, fehlten.

E. Die Versuche mit radioaktiven Isotopen

I. Versuchsanstellung

In den Isotopen-Versuchen wurden in jedem Teilversuch 250 Samen in Petrischalen zur Keimung gebracht, in denen sich 70 cm^3 gewaschener und steriler Quarzsand von Korngröße 0,5—1,5 mm Durchmesser und 25 cm^3 einer Vollsalz-Nährlösung befand, der der radioaktive Schwefel S^{35} und Phosphor P^{32} als Sulfat, bzw. Orthophosphat beigegeben war. In Vorversuchen war die letale Isotopenkonzentration festgestellt worden. Die in den Tabellen angegebene Isotopenkonzentration bezieht sich auf Millicurie je Petrischale. Die Konzentration wurde in den Versuchen von subletalen bis zu unwirksamen Bereichen gestaffelt und die Versuche in kurzen Zeitabständen mehrfach wiederholt. Die Keimung erfolgte in einem Lichtthermostaten bei 20° C, in dem auch die Pflanzen möglichst lange in der Nährlösung verblieben. Wasserverluste wurden durch Zugabe von Aqua dest. ersetzt. Zweimal wurde beim Auftreten starker Hungererscheinungen Nährlösung ohne Isotope zugegeben. Nach 2 Monaten machten die Größenzunahme der Pflanzen und Hungererscheinungen ein weiteres Verbleiben in den Sandkulturen unmöglich, und die Pflanzen wurden in normale Erde pikiert. Zu diesem Zeitpunkt war anzunehmen, daß infolge der Hungererscheinungen die überwiegende Menge der Nährstoffe und Isotope von den Pflanzen aufgenommen war. Der

Hunger hatte, wie die Kontrollen zeigen, keinen merklichen Einfluß auf die Mutabilität. Eine Bestimmung der Isotopenkonzentration in der Pflanze und in einzelnen Zellbestandteilen wurde nicht durchgeführt, da entsprechende Hilfsmittel fehlten und quantitative Versuche aus den schon erwähnten Gründen nicht beabsichtigt waren.

Die Pflanzen zeigten nach der Keimung Fleckungen, Gewebeausfälle und Wuchsstörungen, deren Häufigkeit mit der Isotopenkonzentration zunahm. Infolge der relativ kurzen Halbwertszeiten der Isotope (P^{32} 14,07 Tage, S^{35} 88 Tage) nahmen diese Entwicklungsstörungen rasch wieder ab und hatten sich bis zur Blütezeit völlig verwachsen. Zu diesem Zeitpunkt waren an den behandelten Pflanzen keine Abänderungen und Scheckungen festzustellen. Die Fertilität war an den Pflanzen überraschend gut. Auf jeder behandelten *Ep.-hirsutum*-Pflanze wurden an möglichst dicht beieinanderstehenden Blüten 1—3 Selbstungen und zahlreiche blütenreziproke Kreuzungen mit nicht behandeltem *Ep. parviflorum* durchgeführt. Da die Keimprozente der *Ep.-hirsutum-parviflorum*-Bastarde stets sehr gering sind, mußte jede Kreuzung 5—10mal wiederholt werden, um 50 bis 200 Bastardpflanzen zu erhalten. Die Zahl der verarbeiteten Pflanzen mußte daher relativ klein bleiben.

1953 wurden die Nachkommen der Pflanzen ausgesät, auf denen neben Selbstungen von beiden reziproken Bastardkombinationen soviel Kreuzungen durchgeführt werden konnten, daß 30—200 Pflanzen von jeder Kombination erwartet werden konnten. In den Aussaaten wurde besonders nach Kernmutationen gesucht. 1955 wurden Nachkommenschaften der Pflanzen ausgesät, bei denen die Zeit zur Herstellung genügend vieler Bastardsamen nicht ausgereicht hatte, sondern nur reichlich Selbstungssamen vorhanden waren. In den Aussaaten dieses Jahres wurde besonders nach Mutationen plasmatischer Erbträger gesucht. Dabei mußte anders als bei der Suche nach Kernmutationen vorgegangen werden. Es mußten sämtliche Pflanzenteile genau auf Abweichungen und Flecken geprüft werden. Um Zeit zu gewinnen, wurden die Aussaaten schon im Herbst durchgeführt und in einem Gewächshaus mit Zusatzbeleuchtung kultiviert. Während des langsamen Winterwachstums konnten alle neu zuwachsenden Blätter gründlicher geprüft werden, als das im Sommer an den rasch wachsenden und stark verzweigten Pflanzen möglich ist. Bei allen Pflanzen mit somatischen Abänderungen wurde durch Regenerationsversuche und Stecklingsvermehrung versucht, abgeänderte Sprosse zu erhalten, an denen dann weiterhin die Entwicklung des Musters verfolgt und cytologische Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Infolge dieser zeitraubenden Untersuchungen mußte der Umfang des auszuwertenden Materials erheblich eingeschränkt werden.

II. Die Auswertung der Isotopen-Versuche

Unter den Nachkommen der mit Isotopen behandelten Pflanzen trat eine große Zahl der verschiedensten Abweicher auf, die nach der Art ihres Auftretens, bzw. nach der Art ihrer Musterung zu verschiedenen Gruppen zusammengefaßt wurden. Sie wurden vorläufig in folgender Weise klassifiziert:

I. Es wurden die *Nachkommenschaften behandelter Pflanzen*, in denen *mehrere meistens gleichartig abgeänderte* Individuen auftraten, den Nachkommenschaften mit Einzelabweichern (s. II) gegenübergestellt. Bei den Nachkommenschaften mit zahlreichen abgeänderten Individuen ist anzunehmen, daß die Mutation schon in der behandelten Pflanze

entstand und sich im Laufe der somatischen Entwicklung über mehrere Zelldeszendenzen und auf mehrere Gonen verteilt hat. Die Mutationshäufigkeit ist aus dem Verhältnis abgeänderter und normal gebliebener Nachkommenschaften zu berechnen. Bei der Behandlung mit radioaktiven Isotopen ist die Isotopenwirkung über einen von der Halbwertszeit des Isotops abhängigen Zeitraum ausgedehnt. Es dürfte von Interesse sein, die Dauer und den Abfall der Isotopenwirkung auf Grund der Halbwertszeiten abzuschätzen. In den Tabellen 2—5 ist die Aktivität der Isotope zu Beginn der Versuche in Millicurie je Versuch (Petrischale) angegeben. In Tabelle 2 ist angegeben, auf wieviel Millicurie die Aktivität zur Blütezeit und zur Zeit der Samenkeimung der Nachkommen auf Grund der Halbwertszeit abgesunken ist.

Tabelle 2. *Relative Aktivität der Isotope*

	Zu Beginn der Versuche	Zur Zeit der Blütenbildung	Zur Zeit der Samenkeimung der F_1
S^{35}	< 0,06 mC	< 0,02 mC	< 0,004 mC
	0,12—0,15 mC	0,04—0,05 mC	0,007—0,009 mC
	0,23—0,47 mC	0,07—0,14 mC	0,01—0,03 mC
P^{32}	0,12—0,21 mC	0,00006—0,0001 mC	
	0,32—3,30 mC	0,00016—0,0017 mC	

Der Vergleich dieser Werte mit den Ausgangswerten und den beobachteten Mutationshäufigkeiten zeigt, daß beim Phosphor zur Zeit der Blütenbildung die Aktivität auf Werte abgesunken ist, die vernachlässigt werden können. Beim Schwefel sind während der Embryoentwicklung noch direkte Einwirkungen denkbar. Nach der Samenkeimung der Nachkommenschaften ist aber auch die Aktivität des Schwefelisotops kaum mehr von Bedeutung.

Die Gruppe mit mehreren meistens gleichartigen Abänderungen wurde nun weiter unterteilt in:

1. Nachkommenschaften mit *typischen Mendelspaltungen* und in Nachkommenschaften (vgl. 2) mit mehreren, aber nicht mendelnden Abweichern.

Da die Selbstungsnachkommenschaften verhältnismäßig umfangreich gehalten worden waren und beim Auftreten von Abweichern durch Nachsaat der restlichen Selbstungssamen auf 200—500 Pflanzen erhöht wurden, ließen sich Mutationen von Kerngenen mit relativ großer Sicherheit auszählen. Nur in einigen kritischen und interessanten Fällen, wie bei Mehrfachspaltungen, wurden noch weitere Kreuzungen durchgeführt. Einige fragliche Fälle mit geringen quantitativen, stark modifizierbaren Wuchsunterschieden wurden nicht weiter untersucht und sind in Tabelle 3 getrennt angeführt. Über die Ergebnisse der Versuche

1953 wurde schon kurz berichtet (MICHAELIS-KAPLAN 1953). Die Versuche 1955 bestätigten diese Ergebnisse. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse beider Jahre an *Epilobium hirsutum* zusammengefaßt. Die Rate der Kernmutationen ist nach Isotopenbehandlung ungewöhnlich hoch und nimmt mit der Dosis zu. In zahlreichen Nachkommenschaften wurden nebeneinander mehrere Mutanten gefunden, in 2 Fällen sogar tetrahybride Spaltungen. Insgesamt traten nach Behandlung von nur 405 Pflanzen 160 sichere und 46 fragliche Kernmutanten auf. Zweck dieser Versuche war, von den beiden *Epilobium*-Arten, *Ep. hirsutum* und *Ep. parviflorum*, möglichst viele Mutanten zu erhalten und ihre Manifestation in verschiedenen Plasmen zu untersuchen. Über diese Untersuchungen ist an anderer Stelle berichtet worden (MICHAELIS 1954c, 1958b).

Unter den Mutanten wurden auch 2 labile Gene gefunden, das eine bei *Ep. hirsutum*, das zweite in den Mutationsversuchen an *Ep. parviflorum*. In beiden Fällen traten unter den Keimpflanzen 25% blasse Sämlinge auf, die auf den Laubblättern grüne Spritzer und Flecken ausbildeten. Trotz einer oberflächlichen Ähnlichkeit mit Plastidenschecken ließen sich die Muster leicht unterscheiden (vgl. Abb. 1 bei MICHAELIS 1957a). Es fehlte an den Pflanzen mit labilen Genen die charakteristische Verschachtelung der Teilareale, und es fehlte die phasische Veränderung der Musterung, wie sie nach einer Plasmaentmischung erwartet werden muß. Bei der schlecht lebensfähigen *hirsutum*-Mutante blieb die Fleckenhäufigkeit je Arealeinheit in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanzen ungefähr gleich. Bei der *parviflorum*-Mutante war die Häufigkeit der grünen Flecken an den Sämlingsrosetten gering. Sie waren weiß mit einzelnen grünen Flecken. Am Blühsproß nahm die Fleckenhäufigkeit so stark zu, daß die Pflanzen grün erschienen und nur selten noch weiße Areale besaßen. Die Überwinterungsrosetten waren wieder wie die Sämlingsrosetten überwiegend weiß. Es trat hier also doch eine Periodizität auf, die aber in Beziehung zu den Umweltsbedingungen der Pflanze stand. Die Periodizität nach Plastidenmutation ist von der Umwelt weitgehend unabhängig und wird autonom durch die Zahl der Erbeinheiten je Zelle und die von ihr abhängigen Gesetzmäßigkeiten der Plasmon-Umkombination bestimmt. Die Scheckung beider labiler Genmutanten wird durch Vater und Mutter auf die Nachkommen übertragen.

2. Nachkommenschaften mit *mehreren, nicht mendelnden* Abweichern.

Die hierher gehörenden Nachkommenschaften enthielten nur einzelne wenige (unter 5%) Abweicher. Es kann sich bei diesen Pflanzen um die verschiedensten Abweicher handeln, z. B. um Genmutationen, die erst relativ kurz vor Bildung des Archespors entstanden, um chromosomale Störungen oder aber auch um Abänderungen des plasmatischen Erbgutes.

Tabelle 3. *Häufigkeit der Kernmutanten nach Behandlung von Epilobium hirsutum (Aussaaten 1953 und 1955) mit radioaktivem S^{35} und P^{32}*

Behandlung mit		Anzahl der F_1-Nachkommenschaften = Anzahl der behandelten Pflanzen	Prozent der völlig normalen Nachkommenschaften	Nachkommenschaften mit sicheren Kernmutationen: Prozentuale Anzahl der Nachkommenschaften mit Genmutationen				Gesamtzahl der sicheren Kernmutanten (Gruppe I 1)	Fragliche Kernmutanten (vgl. I 1)	Anzahl der Einzelabweicher (Gruppe I 2, II 1)
Isotop	Konzentration je Petrischale Anfangsaktivität in mC			1	2	3	4			
S^{35}	< 0,06 mC	85	51,8%	4,7%	0	0	0	4	2	8
	0,12—0,15 mC	96	47,9%	24,0%	2,1%	0	0	27	9	8
	0,23—0,47 mC	120	24,2%	26,7%	9,2%	4,2%	1,7%	77	16	16
	Gesamtzahl der Nachkommenschaften und Mutanten	301	—	59	26	15	8	108	27	32
P^{32}	0,12—0,21 mC	64	42,2%	20,3%	7,8%	0	0	23	11	11
	0,32—3,30 mC	40	17,5%	32,5%	12,5%	5,0%	0	29	8	4
	Gesamtzahl	104	—	26	20	6	0	52	19	15
	Kontrollen	57	73,7%	0	0	0	0	0	0	3

Für die somatischen Genmutanten ist charakteristisch, daß meistens alle Abweicher einer Nachkommenschaft einander gleich sind. Bei den übrigen Abänderungstypen ist diese Notwendigkeit nicht gegeben. Bei den plasmatischen Abänderungen treten häufig eine ganze Reihe verschiedener Abänderungstypen auf. Entsteht vor Bildung der Geschlechtszellen eine Plastidenmutation, so ist anzunehmen, daß die mutierten Plastiden durch intraindividuelle Umkombination auf verschiedene Zelldeszendenzen verteilt werden. Unter den Nachkommenschaften treten Schecken auf, die alle denselben abgeänderten Plastidentyp besitzen, sich aber durch verschiedene Entmischungsgrade unterscheiden können. Die auf solche Weise entstehenden Unterschiede in der Musterung der Pflanzen sind in der Regel gering. In den Mutationsversuchen entstand auch die Plasmon-Abänderung *irregulare*, die spontan sehr häufig am *Ep. hirsutum* × *parviflorum*-Bastard auftritt. Aus den dort ausgeführten Versuchen ist bekannt, daß die *irregulare*-Abänderung sowohl bei vegetativer wie bei generativer Vermehrung stets die weiteren Plasmonabänderungen *poliogramma*, *rhytidiophyllum* und *diversivirescens* abgibt. Es ist daher verständlich, daß in Nachkommenschaften isotopen-behandelter Pflanzen, die Pflanzen des *irregulare*-Komplexes enthalten, in der Mehrzahl der Fälle diese verschiedenen Abänderungstypen nebeneinander auftreten. Überraschend war jedoch, daß in solchen Fällen häufig auch noch *albomaculatum*-Schecken auftraten. Die Nachkommenschaften

Tabelle 4. *Häufigkeit der F_1-Nachkommenschaften isotopen-behandelter Pflanzen, die mehrere abgeänderte Pflanzen mit kompliziert verschachtelter Musterung enthielten (Versuch 1955)*

Behandlung mit		Anzahl der F_1-Nachkommenschaften, bzw. der behandelten Pflanzen	Anzahl der F_1-Nachkommenschaften mit mehreren Abänderungen	Anzahl der insges. abgeänderten F_1-Pflanzen				
				albomaculata				
Isotop	Anfangsaktivität in Millicurie (je Petrischale)			mit deutlichen Plastiden-Unterschieden*	ohne mikroskopisch deutlich sichtbare Plastiden-Unterschiede	Cytoplasmonabänderungen, z. B. des *irregulare*-Komplexes	Fragliche Abweicher	Σ
S^{35}	<0,06 mC	64	4	6(+4)	6	10	2	24
	0,12—0,15 mC	43	3	2(+1)	3	4	2	11
	0,23—0,47 mC	49	3	2(+2)	5	0	5	12
	Σ	156	10	10(+7)	14	14	9	47
P^{32}	0,12—0,21 mC	37	0	0	0	0	0	0
	0,32—3,30 mC	16	1	1	1	2	0	4
	Σ	53	1	1	1	2	0	4
	Σ	209	11	11(+7)	15	16	9	51
Kontrolle		35	1	0	1	1	1	3

* Vgl. Anmerkung zu Tabelle 5.

enthielten in ganz unregelmäßigen Zahlen eine ganze Reihe sehr verschiedener Plasmaabänderungen. Es wird an anderer Stelle noch ausführlicher zu besprechen sein, daß bei *irregulare*-Pflanzen sehr häufig die spontane Abänderungsrate der *albomaculata* erhöht wird und daß auch bei *albomaculatum*-Pflanzen wesentlich häufiger neue *albomaculatum*-Typen entstehen, als nach der Höhe der spontanen *albomaculatum*-Rate zu erwarten wäre. Es ist aus den Versuchen von RHOADES (1943, 1946) und WOODS-DU BUY (1951) bekannt, daß unter dem Einfluß bestimmter Kerngene eine sprunghafte Zunahme von Plastidenabänderungen stattfinden kann. Die Versuche an *Epilobium* machen es wahrscheinlich, daß eine ähnliche Zunahme auch unter dem Einfluß plasmatischer Erbänderungen erfolgen kann. In bezug auf Einzelheiten muß auf eine spätere Veröffentlichung verwiesen werden. In Tabelle 4, in der die Häufigkeit der Nachkommenschaften mit Plasmaabänderungen angegeben ist, konnte daher keine eindeutige Aufgliederung in Nachkommenschaften mit albomaculaten Pflanzen und solche mit Pflanzen des *irregulare*-Komplexes vorgenommen werden. Die Aufgliederung der unter den Nachkommenschaften aufgetretenen Einzelpflanzen erfolgte nach den unter II. geschilderten Prinzipien.

II. Nachkommenschaften, in denen nur *einzelne Pflanzen* abgeändert waren oder — falls mehrere Abweicher auftraten — diese voneinander

Tabelle 5. *Anzahl der Einzelpflanzen mit kompliziert verschachtelter Musterung (vgl. Gruppe II 2) unter den F_1-Nachkommen der isotopen-behandelten Pflanzen (Versuch 1955)*

Behandlung mit		Anzahl der F_1-Nachkommen der behandelten Pflanzen	*albomaculata*			Cytoplasmon-Abänderungen z. B. des *irregulare*-Komplexes	Fragliche Abänderungen	Σ
Isotop	Anfangsaktivität in Millicurie (je Petrischale)		mit deutliche(n) mikroskopische(n) Unterschiede(n)	ohne	in %			
S^{35}	< 0,06 mC	4626	2	4	0,13%	0,06%	5	14
	0,12—0,15 mC	2958	0	8	0,27%	0,07%	16	26
	0,23—0,47 mC	3252	2	23	0,77%	0,12%	7	36
	Σ	10836	4	35	39	9	28	76
P^{32}	0,12—0,21 mC	2762	2(+2)	2	0,14%	0,11%	4	11
	0,32—3,30 mC	1127	1	2	0,27%	0,09%	2	6
	Σ	3889	3(+2)	4	7(+2)	4	6	17
Kontrolle		4036	3(+2)	7	0,25%	0,05%	2	14
	Σ	18761	10(+4)	46	56(+4)	15	36	107

In Klammern sind die an *albomaculatum*-Pflanzen sekundär entstandenen Scheckungen angefügt, die sich durch die Art der Abänderung oder der Musterbildung von der primär entstandenen Abänderung unterscheiden. Darüber wird an anderer Stelle zu berichten sein.

verschieden waren. Die Mutationen dürften während der Bildung der Geschlechtszellen oder erst während der Embryoentwicklung der neuen Generation erfolgt sein. In dieser Gruppe errechnet sich die Mutationshäufigkeit aus dem Verhältnis abgeänderter Einzelpflanzen und der Gesamtzahl der aufgezogenen Pflanzen. Die Gruppe wurde weiter unterteilt (Tabelle 3—5) in:

1. Pflanzen, die als *Ganzes abgeändert* waren oder einzelne *einfache abgeänderte Sektoren* enthielten und in Pflanzen mit einer kompliziert verschachtelten Musterung (vgl. 2). In der Gruppe der als Ganzes abgeänderten Einzelpflanzen können sowohl nucleäre wie plasmatische Abänderungen vorkommen, ohne daß dies an der Musterung zu erkennen wäre. Bei den nucleären Abänderungen wird es sich neben seltenen, dominanten, somatischen Genmutationen in vielen Fällen um chromosomale Störungen handeln. Sie ließen sich in einigen Fällen verhältnismäßig leicht durch eine Untersuchung der Pollentetraden belegen. Bei einer Pflanze hatte die Mehrzahl der Pollenkörner mehr als 3 Keimporen, wie das für polyploide Pflanzen kennzeichnend ist. Andere Pflanzen oder Sektoren enthielten höhere Prozentsätze gestörter Pollentetraden. In solchen Tetraden zeigten mehr oder weniger als 4 Pollenkörner je „Tetrade", Zwergkörner und Körner mit abnormen Keimporenzahlen Störungen der Meiose an.

Neben Abänderungen des nucleären Erbgutes kommen aber auch plasmatische Abänderungen in Frage. Wandern die abgeänderten plasmatischen Erbträger bei den Zellteilungen stets gerichtet in eine der beiden Tochterzellen oder werden sie schneller vermehrt als die normalen Erbträger, so kann es so schnell zu homoplasmonisch abgeänderten Zellen kommen, daß eine Aufspaltung fehlt oder übersehen wird. Es können nur eine einzige abgeänderte Zelldeszendenz und einfache Muster, die von Mustern durch nucleäre Erbabänderungen nicht zu unterscheiden sind, entstehen. Eine Unterscheidung kann hier nur durch weitere Untersuchungen, vor allem durch Erbversuche erbracht werden. Da das Ziel des Mutationsversuches die Gewinnung von Plastidenmutanten und die Untersuchung der Plastiden-Umkombination war, und diese Untersuchung alle Zeit in Anspruch nahm, so mußten weitere Versuche mit den Pflanzen dieser Abänderungsgruppe leider unterbleiben.

2. Die abgeänderten Pflanzen mit einer *kompliziert verschachtelten Musterung* wurden in folgender Weise noch weiter unterteilt:

a) Abänderungen, bei denen die Einzelareale der Muster *nicht zufallsgemäß* über die Pflanze verteilt waren. Hier ist anzunehmen, daß die abgeänderten Erbträger nicht völlig zufallsgemäß bei der Zellteilung verteilt werden, sondern bevorzugt in Tochterzellen mit einer bestimmten Lagerung gelangen. Hierher gehören 3 *albomaculatum*-Schecken, bei der die Flecken bevorzugt in der Blattspitze und an den Blatträndern lagen. Hierher gehören weiter eine Anzahl von Pflanzen, die der am *Epilobium-hirsutum-parviflorum*-Bastard spontan auftretenden Plasmon-Abänderung *diversivirescens* glichen. Die Seitensprosse aller der hierher gehörenden Pflanzen zeigten bevorzugt eine periklinale Anordnung der abgeänderten Gewebe, während sonst Periklinalchimären relativ selten entstanden. Über die Abänderungen dieser Gruppe wird an anderer Stelle zu berichten sein.

b) Abänderungen, die völlig den spontan entstehenden *irregulare*-Plasmon-Abänderungen des *Ep.-hirsutum* × *parviflorum*-Bastardes entsprachen (MICHAELIS 1949, 1954b). Die Muster der *irregulare*-Abänderung gleichen in mancher Beziehung den Mustern der *albomaculatum*-Pflanzen, so daß angenommen werden muß, daß hier ebenfalls eine begrenzte Anzahl plasmatischer Erbkomponenten, bzw. Plasmaaggregate in ähnlicher Weise umkombiniert werden wie die Plastiden der Plastidenschecken. Der wesentlichste Unterschied gegenüber der Plastidenvererbung beruht darin, daß nicht nur Gewebe mit normalen und *irregulare*-Zellen entstehen, sondern daß aus *irregulare*-Zellen im Laufe der somatischen und generativen Umkombination eine ganze Reihe neuer Plasmonabänderungen abgespalten werden. Auch bei den im Mutationsversuch entstandenen *irregulare*-Pflanzen entstanden bei vegetativer Vermehrung

die weiteren Plasmonabänderungen: *poliogramma*, *rhytidiophyllum* und *diversivirescens*. Bei den in Gruppe I 2 eingegliederten Nachkommenschaften, in denen mehrere Pflanzen mit Plasmonabänderungen entstanden, kamen stets *irregulare*-, *rhytidiophyllum*- und *diversivirescens*-Pflanzen nebeneinander vor. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese (MICHAELIS 1954b), daß die Abänderungen des *irregulare*-Komplexes nicht auf Abänderungen eines Plasmaorganelles beruhen, sondern auf ± reversiblen Plasmaaggregationen, die unter bestimmten Bedingungen gesprengt werden können. Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, daß in den Mutationsversuchen keine der übrigen am *Ep.-hirsutum* × *parviflorum*-Bastard spontan entstehenden Cytoplasmonabänderungen aufgetreten ist sondern nur die *irregulare*-Abänderung. Die oben wiedergegebenen theoretischen Überlegungen über den Zusammenhang zwischen der Zahl der plasmatischen Erbeinheiten je Zelle und der Entmischungsmöglichkeit von Plasmamutanten würden es verständlich machen, daß wohl eine begrenzte Anzahl von Plasmaaggregaten, nicht aber eine Mutation unter zahlreichen Cytoplasma-Erbeinheiten homoplasmonisch werden kann.

In einem späteren Abschnitt (MICHAELIS 1958c) wird zu besprechen sein, daß die in den Mutationsversuchen entstandene *irregulare*-Abänderung ebenso wie die spontan aufgetretene *irregulare*-Abänderung des *Ep.-hirsutum* × *parviflorum*-Bastardes durch die Mutter, nicht aber durch den Vater weitervererbt wird.

c) Schließlich gehören hierher die typischen *albomaculatum*-Schecken, die ein verschachteltes Muster aus ± chlorophylldefekten und normalen Zellen zeigten. Es wird in einem späteren Abschnitt zu besprechen sein, daß sich die Gruppierung auf Grund der Musteranalyse durchaus bewährte. Soweit nicht die chlorophylldefekten Zellen vorzeitig eliminiert wurden und soweit Kreuzungen auf albomaculaten Sproßteilen möglich waren, zeigen alle Schecken mit einer verschachtelten, phasisch ablaufenden Musterung einen mütterlichen, nicht mendelnden Erbgang. Es dürfte also berechtigt sein, die Musteranalyse der Kreuzungsanalyse gleichberechtigt an die Seite zu stellen und zum mindesten in den Fällen, in denen Kreuzungsversuche infolge früher Elimination oder Sterilität nicht möglich sind, die Fälle einer verschachtelten, sich phasisch verändernden Musterung einer Plasmavererbung im weitesten Sinne zuzuteilen. Dieser Gruppe von *albomaculatum*-Schecken vor allem galten die weiteren Untersuchungen.

Es ist an anderen Stellen ausgeführt worden (MICHAELIS 1954b, 1955a, b, 1957a), daß es nicht berechtigt ist, alle *albomaculatum*-Schecken einer Plastidenvererbung zuzuteilen. Um zu einer genaueren Lokalisation der Erbunterschiede zu kommen, wurden alle *albomaculata* auf Grund einer weiteren Musteranalyse, vor allem auf Grund einer

Tabelle 6. *Liste der in den verschiedenen Versuchen (1954—1957) erhaltenen albomaculaten Pflanzen*

	Plastidentyp (vgl. MICHAELIS 1958 c)										Σ
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	
Pflanzen mit echten Mischzellen (Plastom-Vererbung)	—	—	1	2	1	7	16	17	6	0	50
Pflanzen ohne Mischzellen (Plasmon-Vererbung, nicht genauer lokalisierbar)	—	—	2	4	2	4	2	10	5	1	30
Vorhandensein von Mischzellen fraglich oder nicht bestimmbar . . .	44	37	0	4	0	3	1	2	1	0	92
Σ	44	37	3	10	3	14	19	29	12	1	172

mikroskopischen Untersuchung der Zellmuster und der Plastidenverteilung in den Zellen weiter untergliedert (vgl. MICHAELIS 1957 a) (Tabelle 6).

α) Schecken, die während der Entmischungsphase *echte heteroplastomatische Mischzellen* (d. h. Zellen, in denen scharf geschieden mutierte und normale Plastiden in charakteristischen Mischungsverhältnissen vorkommen) enthalten. Es wird noch ausführlicher zu diskutieren sein, daß in diesen Fällen eine echte Plastidenvererbung anzunehmen ist, bei der Form und Funktion jedes einzelnen Plastiden im wesentlichen von den Erbträgern bestimmt werden, die in jedem dieser Plastiden lokalisiert sind.

β) Schecken, die auch während der eigentlichen Entmischungsphase *keine Mischzellen* besitzen. Hier sind nach unseren bisherigen Kenntnissen zwei Möglichkeiten gegeben: Es kann sich um eine Mutation von Plastidengenen handeln, wobei aber die von den Plastidengenen ausgehenden Wirkketten sämtliche Plastiden einer Zelle in derselben Weise beeinflussen. Mischzellen fehlen ebenfalls, wenn extraplastidale, plasmatische Erbträger auf Entwicklung und Funktion der Plastiden Einfluß nehmen. Eine Unterscheidung beider Möglichkeiten ist theoretisch möglich, z. B. durch Bestimmung der Entmischungsgeschwindigkeit der maßgeblichen Erbfaktoren (MICHAELIS 1955, 1957 b), doch sind unsere derzeitigen Kenntnisse noch zu gering, um solche Unterscheidungen im Rahmen eines Mutationsversuches durchführen zu können.

γ) Bei der mikroskopischen Untersuchung der *albomaculatum*-Schecken auf das Vorkommen oder Fehlen von Mischzellen bleibt eine Reihe von Schecken, bei denen *eine eindeutige Entscheidung nicht möglich* ist. Bei einzelnen Schecken werden die mutierten Zelldeszendenzen zu früh eliminiert, bei anderen sind die durch Mutation hervorgerufenen Unterschiede zwischen mutierten und normalen Plastiden zu gering, um durch einfache Untersuchung im Lichtmikroskop Mischzellen sicher

feststellen zu können. Schließlich können durch Wechselwirkung normaler und mutierter Plastiden und durch Wechselwirkung normaler und abgeänderter Zellen Komplikationen entstehen, die eine Entscheidung außerordentlich erschweren. In Tabelle 4—6 sind die in den Versuchen beobachteten Häufigkeiten wiedergegeben. Sie zeigen, daß die Häufigkeit der Plastiden- und Plasmamutanten (*irregulare*-Komplex) gering ist und daß sich zum mindesten die Häufigkeit der Plastidenabänderungen durch Isotopenbehandlung steigern läßt (Tabelle 5). Vergleiche mit der Häufigkeit der Kernmutanten sind zwar naheliegend, doch müssen dagegen auf Grund der angeführten theoretischen und praktischen Schwierigkeiten erhebliche Bedenken angemeldet werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

In den einleitenden theoretischen Kapiteln sind einige Eigenheiten der Plasmavererbung besprochen, die bei der Durchführung von Mutationsversuchen zu berücksichtigen sind. Die sehr verschieden große *Zahl gleichartiger Erbträger* je Zelle bedingt, daß der Zeitpunkt des Sichtbarwerdens einer Mutation von den Wechselwirkungen der Erbträger untereinander abhängig ist. Nur bei „Dominanz" eines mutierten Erbträgers über alle übrigen normalen Erbträger der Zelle kann die Mutation sofort erkennbar werden. In ähnlicher Weise wird sich eine *Zusammenfassung* gleichartiger Erbeinheiten zu Plasmaorganellen wie z. B. Plastiden auswirken. Erst wenn die mutierten Erbträger durch Vermehrung und Entmischung (= Plasmon-Umkombination) angereichert worden sind, kann sich eine Mutation an den Organellen oder Zellen manifestieren. Solche Verschiebungen im Mengenverhältnis der Erbträger können schon *intracellulär* und *intraindividuell* erfolgen, wobei besonders im Zellverband selektive Vorgänge und entwicklungsgeschichtliche Vorgänge, wie Stillegung der die Mutante enthaltenden Zelldeszendenzen, zu einer Elimination vieler Mutanten führen können, bevor sie erkennbar werden können. Die *Gesetzmäßigkeiten der Plasmon-Umkombination* sind unter anderem von der Zahl der Erbträger je Zelle abhängig. Selbst bei gleicher Mutationshäufigkeit sinkt mit zunehmender Zahl der Erbträger je Zelle die Häufigkeit der auffindbaren Mutanten sehr rasch. Bei den besonders zahlreichen Erbeinheiten des Cytoplasmons erscheint es kaum möglich, daß Cytoplasmon-Mutanten ohne besondere Selektions- und Entmischungs-Mechanismen sichtbar werden können. Quantitative Aussagen über die Höhe der Plasma-Mutationsrate lassen sich erst machen, wenn alle diese Verhältnisse übersehen werden können.

Diese theoretischen Überlegungen führen zu praktischen Hinweisen über die Wahl der Versuchsobjekte und über die Art der Versuchsdurchführung. Die intraindividuelle Plasmon-Umkombination z. B.

bedingt, daß der größte Teil der Plasmamutanten intraindividuell auftritt und an einer charakteristischen *Musterung* des Objektes zu erkennen ist. Zur Kennzeichnung genetisch bedingter Muster gehört unter anderem, daß die Mustergrenzen mit den entwicklungsgeschichtlich bedingten Grenzen der Zelldeszendenzlinien zusammenfallen. Für Muster, die durch zufallsgemäße Plasmon-Umkombination entstehen, ist ein phasischer Ablauf und eine komplizierte Verschachtelung charakteristisch. Für die Mehrzahl von Plastidenmutationen ist das Vorkommen von heteroplastidischen „Mischzellen" während der Entmischungsphase kennzeichnend.

Nach vielen Vorversuchen wurden als mutagene Agentien die radioaktiven Isotope des Schwefels und Phosphors gewählt. Es entstand bei *Epilobium* eine ungewöhnlich große Zahl von Kernmutanten (Tabelle 3). Weiterhin wurde eine mit zunehmender Dosis steigende Zahl von plasmonischen Abänderungen der Plastidenmerkmale und eine geringe Zahl von Cytoplasmon-Mutanten (Tabelle 4—6) gefunden. Die abweichenden Pflanzen wurden auf Grund der Musterung vorläufig klassifiziert. Soweit mit den Mutanten Erbversuche durchgeführt werden konnten, bestätigt der Erbgang diese vorläufige Klassifizierung. Die Musteranalyse vermag also den Erbversuch zu ergänzen und notfalls zu ersetzen. Über die Kreuzungsversuche mit den Mutanten und über ihre cytologische Untersuchung wird in einem zweiten Teil (MICHAELIS 1958c) zu berichten sein.

Der Verfasser dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung seiner Untersuchungen.

Literatur

ARNASON, T. J., I. B. HARRINGTON and H. A. FRIESEN: Inheritance of variegation in barley. Canad. J. Res. **24**, 145—157 (1946). — ARNASON, T. J., and G. W. R. WALKER: An irreversible gene-induced plastid mutation. Canad. J. Res. **27**, 172 bis 178 (1949). — CASPARI, E.: Cytoplasmic inheritance. Advanc. Genet. **2**, 1—66 (1948). — CORRENS, C., u. F. v. WETTSTEIN: Nicht mendelnde Vererbung. In Handbuch der Vererbungswissenschaft. Berlin 1937. 159 S. — DIPPELL, R.. v: Mutations of the killer plasmagene, kappa, in variety 4 of Paramecium aurelia. Amer. Naturalist **82**, 43—58 (1948). — Mutation of the killer cytoplasmic factor in Paramecium aurelia. Heredity **4**, 165—187 (1950). — DÖPP, W.: Gestaltung und Organbildung innerhalb der Gametophyten-Generation der Polypodiaceen unter besonderer Berücksichtigung genetischer Gesichtspunkte. Beitr. Biol. Pflanz. **24**, 201—238 (1937). — EPHRUSSI, B.: Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms. Oxford: Clarendon Press. 1953. 127 S. — EPHRUSSI, B., and H. HOTTINGUER: On an unstable cell state in yeast. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 75—84 (1951). — GRANICK, S.: Plastid structure, development and inheritance. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. I, S. 507—564. Berlin 1955. — GUSTAFSSON, A., u. D. v. WETTSTEIN: Plasmon- und Plastidommutationen. In Handbuch der Pflanzenzüchtung, 2. Aufl., Bd. I, S. 648—655. Berlin 1958. — HEITZ, E., u. R. MALY: Zur Frage der Herkunft der Grana. Z. Naturforsch. **8b**, 243 bis

249 (1953). — Hruby, K.: Durch X-Strahlen hervorgerufene abnorme Plastiden. Soc. roy. Lettr. Sci. Bohème, Sec. XV **1935**. — Imai, Y.: Recurrent auto- and exomutation of plastids resulting in tricolored variegation of Hordeum vulgare. Genetics **21**, 752—757 (1936). — Kaplan, R.: Beeinflussung des durch Röntgenstrahlen induzierten mutativen Fleckenmosaiks auf den Blättern der Sojabohne durch Zusatzbehandlung. Strahlentherapie **94**, 106—118 (1954). — Vortr. auf der Tagg. der Dtsch. Ges. für Genetik in Waldenburg November 1957. — Knudson, L.: Permanent changes of chloroplasts induced by X-rays in the gametophyte of Polypodium aureum. Bot. Gaz. **101**, 721—758 (1940). — Levine, M.: The diverse mate-killers of Paramecium aurelia, variety 8: their interrelations and genetic basis. Genetics **38**, 561—578 (1953). — Lwoff, A., et H. Dusi: La suppression expérimentale des chloroplastes chez Euglena mesnili. C. R. Acad. Sci. (Paris) **119**, 1092—1095 (1935). — Lwoff, A., et P. Schaeffer: La décoloration d'Euglena gracilis par la streptomycine. C. R. Acad. Sci. (Paris) **228**, 779—781 (1949). — Maly, R.: Cytomorphologische Studien an strahleninduzierten, konstant abweichenden Plastidenformen bei Farnprothallien. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 447—478 (1951). — Mazoti, L. B.: Nuevos hallazgos acerca del comportamiento de las unidades de la herencia: genes y plasmonio. Rev. argent. Agronomio **17**, 145—162 (1950). — Variacion citoplasmatica heredable y su reversion por accion de genes simples en Maiz. Rev. Invest. Agricolas **8**, 185—186 (1954). — Michaelis, P.: Über Abänderungen des plasmatischen Erbgutes. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 36—85 (1949). — Grundzüge der intraindividuellen Plasmonumkombination. Protoplasma **39**, 260—274 (1950). — Cytoplasmic inheritance in Epilobium and its theoretical significance. Advanc. Genet. **6**, 287—401 (1954a). — Wege und Möglichkeiten zur Analyse des plasmatischen Erbgutes. Biol. Zbl. **73**, 353—399 (1954b). — Versuche über die Ursachen der Plasmon-Umkombination. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 101—112 (1954c). — Modellversuche zur Plastiden- und Plasmavererbung. Züchter **25**, 209 bis 221 (1955a). — Über die Gesetzmäßigkeiten der Plasmon-Umkombination und über eine Methode zur Trennung einer Plastiden-, Chondriosomen-, bzw. Sphaerosomen (Mikrosomen)- und einer Cytoplasmavererbung. Cytologia **20**, 315—338 (1955b). — Über die Vererbung von Plastidenmerkmalen. Protoplasma **48**, 403 bis 418 (1957a). — Genetische, entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung. II. Über eine Plastidenmutation mit intracellularer Wechselwirkung der Plastiden, zugleich ein Beitrag zur Methodik der Plasmonanalyse und zur Entwicklungsgeschichte von Epilobium. Planta **50**, 60—106 (1957b). — Plasma-Vererbung. In Handbuch der Pflanzenzüchtung, 2. Aufl., Bd. I, S. 140—175. Berlin 1958a. — Über die Bedeutung des plasmatischen Erbgutes für die Mannigfaltigkeit der Gattung Epilobium. Biol. Zbl. **77**, 165—196 (1958b). — Untersuchungen zur Mutation plasmatischer Erbträger, besonders der Plastiden. II. Teil. Planta (Berl.) **51**, H. 6 (1958c). — Michaelis, P., u. R. Kaplan: Über die außerordentlich starke mutagene Wirkung der radioaktiven Isotope P^{32} und S^{35} bei Epilobium. Naturwissenschaften **40**, 534 (1953). — Nothdurft, H.: Zur Theorie der primären Geschwulstursachen. Z. Krebsforsch. **56**, 176—204 (1948). — Pal, B. P.: A new type of variegation in rice. Ind. J. Agric. Sci. **11**, 170—176 (1941). — Perner, E. S.: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von Chlorophytum comosum. Z. Naturforsch. **11b**, 560—573 (1956). — Preer, J. R.: The killer cytoplasmic factor kappa. Amer. Naturalist **82**, 35—42 (1948). — Microscopically visible bodies in the cytoplasm of the „killer" strain of Paramecium aurelia. Genetics **35**, 344—362 (1950). — Preer, J. R., R. W. Siegel and P. S. Stark: The relationship between kappa and paramecin in Paramecium aurelia. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 1228 bis

1233 (1953). — PRINGSHEIM, E. G.: The interrelationships of pigmented and colorless flagellata. Biol. Rev. **16**, 191—204 (1941). — The loss of chromatophores in Euglena gracilis. New Phytologist **47**, 52—87 (1948). — PRINGSHEIM, E. G., and O. PRINGSHEIM: Experimental elimination of chromatophores and eye-spot in Euglena gracilis. New Phytologist **51**, 65—76 (1952). — PROVASOLI, L., S. H. HUTNER and I. J. PINTNER: Destruction of chloroplasts by streptomycin. Cold Spr. Harb. Symp quant. Biol. **16**, 113—120 (1951). — PROVASOLI, L., S. H. HUTNER and A. SCHATZ: Streptomycin-induced chlorophyll-less races of Euglena. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **69**, 279—282 (1948). — RENNER, O.: Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. Ber. sächs. Akad. Wiss., Math.-phys. Kl. Leipzig **86**, 241—266 (1934). — Zur Kenntnis der nicht mendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora (Jena) **30**, 218—290 (1936). — RHOADES, M. M.: Genic induction of an inherited cytoplasmic difference. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **29**, 327—329 (1943). — Plastid mutations. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **11**, 202—207 (1946). — Interaction of genic and non-genic hereditary units and the physiology of nongenic inheritance. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. I, S. 19—57. Berlin 1955. — ROBBINS, W. J., A. HERVEY and M. E. STEBBINS: Euglena and vitamin B_{12}. Ann. N.Y. Acad. Sci. **56**, 818—830 (1953). — ROTTMANN, W.: Versuche zur Gewinnung abweichender Formen mit Farnsporen und Gametophyten. Beitr. Biol. Pflanz. **26**, 1—80 (1939). — SIRKS, M. J.: A case of bud variation in Phaseolus caused by a transitary plasmatic change. Genetica **20**, 121—158 (1938). — SLONIMSKI, P.: Action de l'acriflavine sur les levures. IV. Ann. Inst. Pasteur **76**, 497—530 (1949). — SLONIMSKI, P., et B. EPHRUSSI: Action de l'acriflavine sur les levures. V. Ann. Inst. Pasteur **77**, 47—64 (1949). — SONNEBORN, T. M.: The cytoplasm in heredity. Heredity **4**, 11—36 (1950). — Heredity, development, and evolution in Paramecium. Nature (Lond.) **175**, 1100—1107 (1955). — STRUGGER, S.: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsch. bot. Ges. **64**, 69—83 (1951). — Die Proplastiden in den jungen Blättern von Agapanthus umbellatus L'Hérit. Protoplasma **53**, 120—173 (1954). — WEIER, T. E., and C. R. STOCKING: The chloroplast: Structure, Inheritance, and Enzymology. II. Bot. Rev. **18**, 14—75 (1952). — WEYLAND, H.: Untersuchungen über die Beeinflussung der Pflanze durch chemische Substanzen und ihre Bedeutung für die Beurteilung gewisser medizinischer Fragen. Z. Krebsforsch. **56**, 148—164 (1948). — WILDMAN, S. G., and M. COHEN: The chemistry of plant cytoplasm. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. I, S. 243—300. Berlin 1955. — WOODS, M. W., and H. G. DU BUY: Hereditary and pathogenic nature of mutant mitochondria in Nepeta. J. nat. Canc. Inst. **11**, 1105—1151 (1951). — The action of mutant chondriogenes and viruses on plant cells with special reference to plastids. Amer. J. Bot. **38**, 419—434 (1951).

Dr. PETER MICHAELIS,
Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Erwin-Baur-Institut),
Köln-Vogelsang

Planta, Bd. 51, S. 635—644 (1958)

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Bonn

ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN γ-AMINOBUTTERSÄURE UND GLUTAMINSÄURE BEI CHLORELLA VULGARIS VAR. VIRIDIS

Von

HORST KATING

(Eingegangen am 11. März 1958)

A. Einleitung

O. WARBURG u. Mitarb. (1956, 1957a, b, c) erörtern neuerdings einen Zusammenhang zwischen Glutaminsäure, γ-Aminobuttersäure und der CO_2-Assimilation bei *Chlorella*: Die anaerob durch die Aktivität der Glutaminsäuredecarboxylase entstehende γ-Aminobuttersäure reagiere aerob mit CO_2 zu Glutaminsäure zurück. Es stelle sich unter aeroben Bedingungen ein stationärer Zustand zwischen Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure ein. Dem Zerfall der Glutaminsäure entspricht eine Hemmung der Photosynthese, und so schließen die Autoren auf eine wahrscheinliche Funktion der Aminosäuren bei der Bindung und Reduktion der Kohlensäure im Prozeß der Photosynthese.

Es ist aber bekannt, daß Glutaminsäure auch durch Transaminierung der γ-Aminobuttersäure mit α-Ketoglutarsäure gebildet werden kann. Diese Reaktion wurde von S. P. BESSMAN, J. ROSSEN und E. C. LAYNE (1953), E. ROBERTS u. Mitarb. (1953a, b), J. K. MIETTINEN und A. J. VIRTANEN (1953) und H. KATING (1954 und 1955a) für tierisches Gewebe, Erbsenwurzeln, *Aspergillus fumigatus*, *Escherichia coli* und *Endomycopsis vernalis* festgestellt. Bei Fortführung meiner eigenen Arbeiten über die Rolle der γ-Aminobuttersäure im Stoffwechsel von Mikroorganismen lag es nach den Veröffentlichungen von O. WARBURG u. Mitarb. nahe, die Reaktionswege der γ-Aminobuttersäure auch in einzelligen Grünalgen zu verfolgen.

B. Material und Methodik

1. Versuchsanordnung. Für die Untersuchung wurde ein Stamm von *Chlorella vulgaris* BEYERINCK *var. viridis* CHODAT verwandt[1], der in einer bei M. E. MEFFERT (1954) angegebenen, nach D. I. ARNON (1938) und W. ROHDE (1948) modifizierten Nährlösung im Dauerlicht angezogen wurde. Als Grundnährlösung der Licht- und Dunkelversuche diente die Salzlösung $^1/_{10}$ S* von O. WARBURG

[1] Der Algenstamm wurde mir freundlicherweise von Fräulein Dr. M. E. MEFFERT von der Kohlenstoffbiologischen Forschungsstation Essen zur Verfügung gestellt. Ihr gebührt auch mein aufrichtiger Dank für die bereitwillige erste Anzucht des Untersuchungsmaterials.

u. Mitarb. (1957c): 1 g $MgSO \cdot 7\,H_2O$, 0,5 g KH_2PO_4, 2000 ml H_2O, 0,06 ml n-H_2SO_4. Dieses Medium wurde je nach der Fragestellung der einzelnen Versuchsansätze abgeändert (s. Versuchsteil). Für die Lichtversuche wurden die Algensuspensionen (jeweils 10 ml) durch einen Satz Osram-Leuchtstofflampen (2 Lampen HNI 202 und 1 Lampe HNT 202) mit 2500 Lux bestrahlt[1]. Bei den aeroben Versuchen wurden die Algen mit Preßluft und in den anaeroben Ansätzen mit Stickstoffgas, das durch Bariumhydroxyd und alkalische Pyrogallollösungen geschickt wurde, durchgast.

2. Analysenmethoden. Bei Abbruch der Versuche wurden die suspendierten Algen während 10 min in einem 90° C warmen Wasserbad abgetötet. Der durch Zentrifugieren gewonnene Heißwasserextrakt wurde auf 1 ml eingeengt. Davon wurden 60 µl zur papierchromatographischen Analyse verwendet. Als Papiere dienten Schleicher und Schüll 2043 b mgl und Whatman Nr. 1, als Laufmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) und mit Citrat-Phosphat gesättigte Phenollösung (F. CRAMER 1954).

Für die enzymatischen Ansätze wurden die frisch zentrifugierten Algen in dichter Suspension mit Chloroform abgetötet und für 12 Std bei 25° C mit den im Versuchsteil beschriebenen Substraten inkubiert. Die Papierchromatographie erfolgte hierbei mit 40 µl Lösung ohne vorherige Einengung. — Zur quantitativen Auswertung wurden die Ninhydrin-Flecken nach E. KAWERAU und TH. WIELAND (1951) in den Kupferkomplex übergeführt und nach der Methode von F. BODE, H. J. HÜBENER, H. BRÜCKNER und K. HOEVELS (1952) nach Methanolextraktion im Spektralphotometer (Zeiss-Opton) bei dem Absorptionsmaximum von 510 mµ bestimmt.

Ammoniakbestimmungen erfolgten mit der Ammoniakdestillationsapparatur nach S. PUCHER (s. T. LAINE u. A. J. VIRTANEN 1941).

C. Versuchsergebnisse

1. Versuche zur Synthese von Glutaminsäure in aeroben und anaeroben Licht- und Dunkelkulturen. Bei *Endomycopsis vernalis* (H. KATING 1955a) wird die Glutaminsäure bei Kohlenhydratmangel *decarboxyliert*, während bei erneuter Kohlenhydratzufuhr eine *Transaminierung* der γ-Aminobuttersäure zu Glutaminsäure erfolgt. Der Versuch, ähnliche Beziehungen bei einzelligen Grünalgen festzustellen, muß unter Berücksichtigung der Anschauungen von O. WARBURG u. Mitarb. über die Rolle der Glutaminsäure bei der CO_2-Assimilation von Chlorellen die Photosyntheseprozesse ausschließen. Einige orientierende Versuche solcher Art sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Versuchsanordnung. Algen für 24 Std in frischer normaler Nährlösung gezogen, zentrifugiert und in 10 ml Nährlösung 1/10 S* suspendiert; je Ansatz 30,5 mg Trockengewicht; Glucosekonzentration 0,02 mol., Belichtung mit 2500 Lux; Versuchsdauer 90 min.

Während der Versuchsdauer ist keine äußere N-Quelle zugegen. Bei Versuchsbeginn ist in den Zellen neben einer erheblichen Menge freier Glutaminsäure (345×10^{-3} mg) nur noch Alanin stärker vertreten

[1] Das Botanische Institut der Universität stellte mir den Satz Leuchtstofflampen zur Verfügung. Herrn Prof. Dr. W. SCHUMACHER und Herrn Dr. H. MATTHAEI sei hierfür bestens gedankt!

Tabelle 1. *Der Einfluß von Glucose-Gaben im Licht und in Dunkelheit auf die aerobe und anaerobe Verarbeitung der freien Aminosäuren der Zelle*

Alle Analysenzahlen sind Mittelwerte aus 2 Parallelansätzen

Versuch Nr.	Versuchsansatz mit N-freier Nährlösung	Freie Aminosäuren in den Zellen[1] (10^{-3} mg)		
		Glutaminsäure	γ-Aminobuttersäure	Alanin
1	Kontrolle bei Versuchsbeginn .	345	Spur	125
2	Licht, aerob	125	Spur	70
3	Licht, anaerob	300	60	130
4	Licht, anaerob, mit Glucose . .	Spur	Spur	60
5	Dunkelheit, aerob	135	140	130
6	Dunkelheit, anaerob, ... mit Glucose	Spur	105	170

[1] Neben den drei in der Tab. 1 aufgeführten Aminosäuren traten noch *schwach* folgende Aminosäuren in den Chromatogrammen auf: Asparaginsäure, Cystin/Cystein und Glycin. Da das Auftreten dieser Aminosäuren nur geringen Schwankungen unterlag, können sie für die vorliegenden Untersuchungen außer Betracht bleiben.

(s. Versuch 1); γ-Aminobuttersäure ist nur in Spuren vorhanden. Je nach den Versuchsbedingungen ändern sich nun diese freien Aminosäuren in recht unterschiedlicher Weise. Unter normalen Photosynthesebedingungen (2) nehmen die freien Aminosäuren ab (Eiweißbildung?). Bei Anaerobiose im Licht (3) setzt eine Decarboxylierung der Glutaminsäure ein. Damit wird der entsprechende Befund von O. Warburg u. Mitarb. bestätigt. Der Versuch 4 zeigt dagegen, daß die Zufuhr von Zucker im anaeroben, belichteten Ansatz sogar einen noch stärkeren Schwund der freien Aminosäuren bewirkt, als es unter normalen Photosynthesebedingungen der Fall ist (2). Gegenüber dem anaeroben Lichtversuch ohne Glucosezusatz (3) fällt das Fehlen der γ-Aminobuttersäure auf.

Versuch 5 erweitert die bisherigen Befunde über die Bedingungen, unter denen eine Decarboxylierung der Glutaminsäure stattfindet: Dunkelheit allein genügt schon, um eine starke Anreicherung der γ-Aminobuttersäure hervorzurufen. Überraschenderweise wird die Decarboxylierung der Glutaminsäure anaerob in Dunkelheit durch Glucosegaben (6) nicht gehemmt; hier ist die Glutaminsäure bis auf Spuren verschwunden, während Alanin sogar verstärkt auftritt. Die Deutung des letzten Befundes bereitet zunächst Schwierigkeiten, kann aber durch die noch folgenden Versuche (s. Tabelle 2) eine Erklärung finden. Weitere Untersuchungen erfordert noch das Ergebnis des anaeroben Lichtversuches mit Glucosegabe (4). Es unterscheidet sich durch das Fehlen der γ-Aminobuttersäure von den Ergebnissen aller

Tabelle 2. *Die Synthese von Glutaminsäure bei Anaerobiose und in Dunkelheit, Versuchsdauer 60 min, Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen, Trockengewicht der Algen 29,3 mg je Ansatz*

Versuch Nr.	Anaerobe Dunkelversuche mit verschiedenen Zusätzen	Freie Aminosäuren in den Zellen (10^{-3}mg)		
		Glutaminsäure	γ-Aminobuttersäure	Alanin
7	60 min, ohne N-Quelle	50	125	130
8	60 min, mit 0,01 mol Glucose	0	110	200
9	60 min, mit 0,01 mol α-Ketoglutarsäure .	80	0	50
10	60 min, mit 0,02 mol NH_4OH[1], die letzten 20 min mit 0,01 mol α-Ketoglutarsäure .	Spur	0	50
11	60 min, mit 0,02 mol γ-Aminobuttersäure	270	Spur	130
12	60 min, mit 0,01 mol Glucose, die letzten 15 min mit 0,02 mol γ-Aminobuttersäure	255	120	105
13	60 min, mit 0,02 mol γ-Aminobuttersäure, die letzten 15 min mit 0,01 mol α-Ketoglutarsäure	450	Spur	300

[1] Mit 0,1 n HCl neutralisiert.

anderen anaeroben Ansätze. Der fast vollständige Verbrauch aller freien Aminosäure der Zelle bei Glucosezufuhr entspricht den Befunden von P. J. SYRETT und L. FOWDEN (1952) über die Aminosäurennutzung von *Chlorella* bei Glucosegabe im aeroben Lichtversuch. Vielleicht liegt die Erklärung für den unterschiedlichen Einfluß der Glucose bei den anaeroben Licht- und Dunkelversuchen (in letzteren verschwindet nur die Glutaminsäure; vgl. auch Tabelle 2) in der von W. SIMONIS und H. KATING (1956) bei *Ankistrodemus* gefundenen gesteigerten Lichtphosphorylierung durch Glucosegaben. Die damit verbundenen günstigeren energetischen Verhältnisse im Licht könnten sich gegenüber den Dunkelversuchen in einer besseren Verarbeitung einzelner Stoffwechselprodukte bemerkbar machen. (Man vergleiche hierzu auch die Versuche 3 und 5, aus denen hervorgeht, daß die Decarboxylierung der Glutaminsäure im anaeroben Lichtversuch geringer ist als im aeroben Dunkelversuch.)

Bei den Versuchen in Tabelle 1 verschwand die freie Glutaminsäure bei Glucosezufuhr rasch. Dies erschwert Rückschlüsse auf ihre Umwandlung (nach M. WINOKUR, 1948, gehört der Versuchsorganismus zu den schnell wachsenden Chlorellen mit einem intensiven Stoffwechsel). In den Ansätzen in Tabelle 2 wurden deshalb die Versuchsbedingungen abgeändert: In Anaerobiose und Dunkelheit sollte durch Angebot von C-Quellen und γ-Aminobuttersäure geprüft werden, ob eine Neubildung von Glutaminsäure unter Ausschluß der Photosynthese möglich

ist. Der Versuchsansatz war im wesentlichen gleich dem in Tabelle 1 (gleiches Algenmaterial!). Die Zusammensetzung der Substrate im einzelnen ist aus der Tabelle 2 zu ersehen.

Die Ergebnisse der Kontrollversuche 7 und 8 entsprechen dem bereits Bekannten aus Tabelle 1: im anaeroben Dunkelversuch wird die Glutaminsäure decarboxyliert. Eine Glucosegabe verhindert diesen Prozeß nicht (vgl. die Ausgangsmenge an Glutaminsäure, Tabelle 1, Versuch 1). Sie hat aber einen Einfluß auf die Weiterverarbeitung der nicht decarboxylierten Glutaminsäure. Ganz anders liegen aber die Verhältnisse bei den Kulturen mit α-Ketoglutarsäure als C-Quelle (9 und 10). Die Ketosäure bewirkt einen weitgehenden Schwund *aller* freien Aminosäuren. — Glucose und die Ketosäure beeinflussen also die Verarbeitung der freien Aminosäuren in der Zelle in sehr verschiedener Weise.

In den Versuchen 11—12 wurde γ-Aminobuttersäure als N-Quelle gegeben. Hier verschwindet die Glutaminsäure im Gegensatz zu den vorhergehenden anaeroben Ansätzen nicht. Sie ist vielmehr in stärkerer Konzentration als in den Kontrollversuchen 7 und 8 nachzuweisen[1]. — Die größte Zunahme der Glutaminsäure (auf 450×10^{-3} mg) bringt schließlich Versuch 13, in welchem γ-Aminobuttersäure *und* α-Ketoglutarsäure geboten wurden. Das ist ein deutlicher Hinweis auf eine Transaminierungsaktion zwischen den im Substrat vorhandenen Reaktionspartnern. Eine direkte Aminierung der α-Ketoglutarsäure durch Ammoniak kann nach den Analysen des Versuches 10 nicht vorliegen. Die Versuchsbedingungen (dunkel, aerob) schließen ferner eine Carboxylierung der γ-Aminobuttersäure aus. — Es kann somit gefolgert werden, daß auch in den Versuchen 11 und 12 eine Transaminierung der γ-Aminobuttersäure zu Glutaminsäure stattgefunden hat (vgl. als Kontrollen: Versuche 7 und 8). Bei größerer Zufuhr des Transaminierungspartners der γ-Aminobuttersäure ergibt sich dann der aus der letzten Spalte der Tabelle 2 ersichtliche bedeutende Anstieg der Glutaminsäure auf 450×10^{-3} mg.

Einer Erklärung bedarf noch die unterschiedliche Verarbeitung der Aminosäuren in den Versuchen mit Glucose- und α-Ketoglutarsäurezusatz. Dieser scheinbare Widerspruch löst sich jedoch durch eine einfache stoffwechselphysiologische Überlegung: Der anaerobe Abbau der Glucose führt bekanntlich zu C_3-Körpern. Unter anderem entsteht hierbei Brenztraubensäure, womit die Anreicherung von Alanin in den

[1] Wie bei allen Glucoseansätzen wird auch in Versuch 12 ein Auftreten von γ-Aminobuttersäure festgestellt. Sicherlich findet während der ersten 45 min eine Glutaminsäuredecarboxylierung statt. Inwiefern sich dann die in der Nährlösung befindliche γ-Aminobuttersäure in Richtung einer (wahrscheinlichen) Neubildung von Glutaminsäure auswirkt, kann noch nicht sicher entschieden werden.

Versuchen 6 und 8 eine Erklärung finden könnte. Durch die anaeroben Versuchsbedingungen ist jedoch eine Umwandlung der entstandenen C_3-Körper (z. B. durch Eintritt in den Citronensäurecyclus) weitgehend unterbunden. α-Ketoglutarsäure wird sich unter diesen Umständen kaum bilden. — Wird jedoch den Algen α-Ketoglutarsäure (unter den gleichen Versuchsbedingungen) zusammen mit γ-Aminobuttersäure geboten, so ist durch das unmittelbare Zusammenkommen der Transaminierungspartner die Neubildung von Glutaminsäure im Versuch 13 (gegenüber 12) hinreichend erklärt. — Ob unter den vorliegenden anaeroben Bedingungen ebenso wie in den Versuchen 3, 5, 6, 7 und 8 auch hier zunächst eine Decarboxylierung der in der Zelle vorhandenen Glutaminsäure stattfindet, braucht in Anbetracht des eindeutig zur Glutaminsäuresynthese verschobenen Gleichgewichtes nicht erörtert zu werden.

2. Versuche zur enzymatischen Transaminierung der γ-Aminobuttersäure mit abgetöteten Algen. Tabelle 3 gibt aus einer umfangreichen Reihe die wichtigsten Versuche zum Nachweis des Enzymsystems der Transaminierung von γ-Aminobuttersäure zu Glutaminsäure mit Rohenzymmaterial wieder.

Versuchsansatz. Die zentrifugierten Algen wurden mit Phosphatpufferlösung $p_H = 7{,}0$ zu einer dichten Suspension aufgeschwemmt und mit Chloroform abgetötet. Gleiche Mengen Algen (71,9 mg Trockengewicht je Ansatz) wurden in Phosphatpufferlösungen $p_H = 7{,}0$ inkubiert, worin in einer Endkonzentration von 0,02 bzw. 0,01 mol die in der Tabelle jeweils angegebenen Substrate enthalten waren. Starke Veränderungen des p_H-Wertes durch die Substrate wurden mit NaOH bzw. HCl-Zusatz ausgeglichen. Gesamtvolumen 10 ml je Versuchsansatz. Versuchsdauer 12 Std bei 25° C. Als parallele Reihen wurden die Ansätze jeweils ohne und mit Zusatz von 1,5 mg krist. Pyridoxal-5′-phosphat versetzt[1]. — Papierchromatographische Analysen mit 40 µl der Lösung. Quantitative Messungen mit dem Spektralphotometer. Die absoluten Gewichtsmengen je Ansatz wurden mit Hilfe von Eichkurven ermittelt.

Die vier am stärksten auftretenden Aminosäuren (Glutaminsäure, γ-Aminobuttersäure, Alanin und Asparaginsäure) wurden quantitativ bestimmt. Die Decarboxylierung der Glutaminsäure wurde noch einmal im Versuch 15a geprüft. Bei Versuchsende waren nach Abzug der Kontrolle (14a) etwa 40,0% der eingesetzten Glutaminsäure zu γ-Aminobuttersäure decarboxyliert.

γ-Aminobuttersäure allein (16a, b) ergibt nur eine unbedeutende Vermehrung der Glutaminsäure. Wird jedoch α-Ketoglutarsäure zugesetzt (17a, b), so tritt eine erhebliche Menge von Glutaminsäure durch Transaminierung auf (1,275 bzw. 1,560 mg), womit eine Abnahme der γ-Aminobuttersäure und des Alanins gekoppelt ist. Im Versuch mit α-Ketoglutarsäure und Ammoniak erfährt die Glutamin-

[1] Der Deutschen Hoffmann-La Roche AG danke ich herzlich für die freundliche Überlassung dieses Präparates.

Tabelle 3. *Enzymatische Decarboxylierung der Glutaminsäure und Transaminierung der γ-Aminobuttersäure in abgetötetem Algenmaterial.* $p_H = 7{,}0$, 12 Std, 25° C. Mittelwerte aus je 2 Parallelversuchen (mg/10 ml)

Versuch Nr.	Substrat	a) ohne Pyridoxal-5′-phosphat				b) mit Pyridoxal-5′-phosphat			
		Glutaminsäure mg	γ-Aminobuttersäure mg	Alanin mg	Asparaginsäure mg	Glutaminsäure mg	γ-Aminobuttersäure mg	Alanin mg	Asparaginsäure mg
14	Kontrolle (Phosphatpuffer)	0,846	0,206	0,302	Spur	0,890	0,103	0,258	Spur
15	0,02 mol Glutaminsäure	17,800	8,860	0,430	Spur	—	—	—	—
16	0,02 mol γ-Aminobuttersäure	0,918	16,900	0,340	Spur	1,125	16,240	0,344	Spur
17	0,01 mol α-Ketoglutarsäure	1,275	Spur	Spur	0,167	1,560	Spur	Spur	0,160
18	0,02 mol NH_4OH + 0,01 mol α-Ketoglutarsäure	1,570	0,214	0	0,206	1,860	Spur	Spur	0,190
19	0,02 mol γ-Aminobuttersäure + 0,01 mol α-Ketoglutarsäure	*3,810*	15,700	0,515	0,298	*5,040*	14,060	0,690	0,505

säure durch zusätzliche Aminierung noch eine weitere Zunahme auf 1,570 bzw. 1,860 mg (18a, b). Den größten Wert erreicht die Glutaminsäurekonzentration jedoch in dem Ansatz mit γ-Aminobuttersäure *und* α-Ketoglutarsäure (19a, b mit 3,810 bzw. 5,040 mg). Auch Alanin und Asparaginsäure nehmen im Versuch 19 stark zu.

Unter Berücksichtigung der Versuche 14, 16, 17 und 18 spricht der Ansatz mit γ-Aminobuttersäure und α-Ketoglutarsäure (19a, b) für eine Transaminierungsreaktion der γ-Aminobuttersäure. Die Steigerung der Glutaminsäure-Werte durch den Zusatz von Pyridoxal-5′-phosphat, das als „Cotransaminase" bekannt ist, bekräftigt diesen Schluß. Damit wird das Vorkommen der Transaminierungsreaktion γ-Aminobuttersäure → Glutaminsäure auch für einen Organismus aus der Gruppe der einzelligen Grünalgen erwiesen.

Ergänzend seien noch die Ergebnisse der quantitativen Ammoniakanalysen erwähnt, die in den Versuchsansätzen mit γ-Aminobuttersäure-Substrat (19a, b) durchgeführt wurden: Es wurde eine Spur NH_4-N gefunden, die innerhalb der Fehlergrenze dem Gehalt der Kontrolle mit Phosphatpuffer (14) entspricht. Die N-Quelle wird also kaum desaminiert, so daß für den Versuch 19 der Blindwert der direkten Aminierung der α-Ketoglutarsäure (18a, b) kaum berücksichtigt werden muß und lediglich die Blindwerte in den Versuchen 16a, b

und 17a, b abzuziehen sind. Danach sind etwa 8,5 bzw. 11,0% der eingesetzten γ-Aminobuttersäure zu Glutaminsäure umaminiert worden. Hierbei bleibt die z.T. erhebliche Steigerung der Alanin- und Asparaginsäurekonzentration, die wohl auf weitere Umsetzungen der Glutaminsäure zurückzuführen ist, unberücksichtigt.

Einige andere enzymatische Versuchsansätze seien noch kurz besprochen: Entsprechend dem Versuchsschema der Tabelle 3 wurde auch eine Transaminierung zwischen γ-Aminobuttersäure und Brenztraubensäure geprüft. Es wurden aber keine Ergebnisse gefunden, die auf eine Transaminierung der γ-Aminobuttersäure mit Brenztraubensäure zu Alanin schließen lassen. Auch Glucosezusatz lieferte keine Anhaltspunkte für eine Transaminierungsreaktion der γ-Aminobuttersäure mit einem eventuellen Intermediärprodukt.

Die Neubildung der Glutaminsäure durch die Transaminierungsreaktion der γ-Aminobuttersäure mit α-Ketoglutarsäure ist also spezifisch. — Die Förderung der Glutaminsäurebildung in dem anaeroben Dunkelversuch mit α-Ketoglutarsäure und γ-Aminobuttersäure der lebenden Algen (Tabelle 2/13) findet durch die enzymatischen Versuchsansätze eine wertvolle Bestätigung.

Diskussion der Ergebnisse

Bei der Hefe *Endomycopsis vernalis* besteht ein Kreislauf zwischen der Decarboxylierung der Glutaminsäure und ihrer Rückbildung durch Transaminierung aus γ-Aminobuttersäure. Kohlenhydratmangel begünstigt den ersten, gute Kohlenhydratversorgung den zweiten Teilprozeß (H. KATING 1955a). Die hier vorgelegten Untersuchungen ergänzen diese Befunde für einen chlorophyllführenden Organismus: Immer wenn die CO_2-Assimilation unterbunden ist, erfolgt eine Decarboxylierung der Glutaminsäure. Wird dagegen α-Ketoglutarsäure als Transaminierungspartner der γ-Aminobuttersäure zugeführt, so überwiegt die Synthese der Glutaminsäure.

Bekanntlich nehmen O. WARBURG u. Mitarb. eine Neubildung der Glutaminsäure in *Chlorella* auf einem anderen Wege an: durch Carboxylierung der γ-Aminobuttersäure bei der CO_2-Assimilation. — Über Carboxylierungen von Aminosäuren ist wenig bekannt. F. C. STEWARD u. J. K. POLLARD (1956) und F. C. STEWARD, R. G. S. BIDWELL u. E. W. YEMM (1956) finden in langfristigen Untersuchungen an Karottenexplantaten (bis zu 109 Std Kulturdauer!) bei Angebot von ^{14}C-markierter γ-Aminobuttersäure einen Teil der Aktivität in Glutaminsäure und Glutamin wieder. Sie schließen daraus auf eine direkte Carboxylierung der markierten γ-Aminobuttersäure. Dazu muß aber bemerkt werden, daß das C-Gerüst der γ-Aminobuttersäure nach Abgabe

der Aminogruppe — die Monoaldehydbernsteinsäure — wieder in den Citronensäurecyclus eintreten kann, so daß auf diesem Wege eine schnelle Bildung von aktiver α-Ketoglutarsäure möglich ist (vgl. hierzu D. E. Green, W. W. Westerfeld, B. Vennesland u. W. E. Knox 1942; E. Roberts und H. M. Bregoff, 1953; D. Shemin u. J. Rittenberg 1951; H. Kating 1955b über die Monoaldehydbernsteinsäure im Stoffwechsel). Die Möglichkeit einer Carboxylierung der γ-Aminobuttersäure kann grundsätzlich nicht in Abrede gestellt werden. Der Befund, daß Glutaminsäure aus γ-Aminobuttersäure gebildet wird, genügt freilich nicht zu ihrem Nachweis. Durch die Versuchsbedingungen und die kritische Auswertung der Ergebnisse müßte gesichert sein, daß die Neubildung der Glutaminsäure nicht auf einer Aminierung der α-Ketoglutarsäure oder einer Transaminierung der γ-Aminobuttersäure beruht. — Auch bei der Erörterung einer *Carboxylierung* der γ-Aminobuttersäure im Photosyntheseprozeß scheinen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die Möglichkeit einer *Transaminierung* der γ-Aminobuttersäure mit α-Ketoglutarsäure Berücksichtigung zu verlangen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Unter anaeroben Versuchsbedingungen und in Dunkelheit wird Glutaminsäure durch *Chlorella vulgaris* var. *viridis* decarboxyliert.

2. Glucosezusatz in anaeroben Dunkelansätzen (ohne N-Quelle im Außenmedium) bewirkt vornehmlich einen Schwund der freien Glutaminsäure der Zellen: Ein Teil der Glutaminsäure wird zu γ-Aminobuttersäure decarboxyliert; Alanin zeigt eine geringe Konzentrationssteigerung. — Bei Zusatz von α-Ketoglutarsäure verschwinden bis auf kleine Reste alle freien Aminosäuren der Zellen. Glutaminsäure wird hierbei anscheinend nicht decarboxyliert.

3. In anaeroben Dunkelversuchen reichert sich Glutaminsäure bei Zusatz von α-Ketoglutarsäure + γ-Aminobuttersäure durch Transaminierung stark an. — Enzymatische Versuchsansätze mit abgetöteten Algen bestätigen diese Transaminierungsreaktion. Pyridoxal-5′-phosphat erhöht die Transaminierungsrate.

4. Es wird darauf hingewiesen, daß die Synthese von Glutaminsäure durch Transaminierung der γ-Aminobuttersäure mit α-Ketoglutarsäure in Versuchen zum Nachweis einer Carboxylierung der γ-Aminobuttersäure (z. B. bei der CO_2-Assimilation im Photosyntheseprozeß) nicht übersehen werden sollte.

Herrn Prof. Dr. M. Steiner danke ich für Ratschläge und verständnisvolle Hilfe bei dieser Arbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen und Fräulein B. Wehner für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

ARNON, D. J.: Amer. J. Bot. **25**, 322—325 (1938). — BESSMAN, S. P., J. ROSSEN and E. C. LAYNE: J. biol. Chem. **201**, 385—391 (1953). — BODE, F., H. J. HÜBENER, H. BRÜCKNER u. K. HOEVELS: Naturwissenschaften **39**, 524 (1952). — CRAMER, F.: Papierchromatographie, 3. Aufl. Weinheim 1954. — GREEN, E. E., W. W. WESTERFIELD, B. VENNESLAND and W. E. KNOX: J. biol. Chem. **145**, 69—84 (1942). — KATING, H.: Naturwissenschaften **41**, 188 (1954). — Arch. Mikrobiol. **22**, 396—407 (1955a); **22**, 235—247 (1955b). — KAWERAU, E., and TH. WIELAND: Nature (Lond.) **168**, 77—78 (1951). — LAINE, T., u. A. J. VIRTANEN: In: Die Methoden der Fermentforschung, herausgg. von E. BAMANN u. K. MYRBÄCK, Bd. 3, S. 2719—2740. Leipzig 1941. — MEFFERT, M. E.: Arch. Mikrobiol. **20**, 410—422 (1954). — MIETTINEN, J. K., u. A. J. VIRTANEN: Acta chem. scand. **7**, 1243—1246 (1953). — ROBERTS, E., P. AYENGAR and J. POSNER: J. biol. Chem. **203**, 195—204 (1953b). — ROBERTS, E., and H. M. BREGOFF: J. biol. Chem. **201**, 393—398 (1953a). — ROHDE, W.: Symb. bot. upsal. **10**, 1—149 (1948). — SHEMIN, D., and J. RITTENBERG, J. biol. Chem. **192**, 315—334 (1951). — SIMONIS, W., u. H. KATING: Z. Naturforsch. **11b**, 165—172 (1956). — STEWARD, F. C., R. G. S. BIDWELL and E. W. YEMM: Nature (Lond.) **178**, 734—738 (1956). — STEWARD, F. C., and J. K. POLLARD: In: Symposium on inorganic nitrogen metabolism, edited by W. D. MCELROY and B. GLASS, p. 377—407, Baltimore 1956. — SYRETT, P. J., u. L. FOWDEN: Physiol. Plantarum (Cph.) **5**, 558—566 (1952). — WARBURG, O., H. KLOTZSCH u. G. KRIPPAHL: Naturwissenschaften **44**, 235 (1957a). — Z. Naturforsch. **12b**, 266 (1957b); **12b**, 622—628 (1957c). — WARBURG, O., u. G. KRIPPAHL: Z. Naturforsch. **11b**, 718 (1956).

Dr. HORST KATING,
Pharmakognostisches Institut der Universität, Bonn, Meckenheimer Allee 170a

Planta, Bd. 51, S. 645—659 (1958)

Aus dem Forstbotanischen Institut München

ÜBER DIE BEDEUTUNG DES HOFTÜPFELVERSCHLUSSES FÜR DIE AXIALE WASSERLEITFÄHIGKEIT VON NADELHÖLZERN*

I. Mitteilung

GRUNDERSCHEINUNGEN

Von

BRUNO HUBER und WALTER MERZ**

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. März 1958)

Einleitung

Im Vergleich zur Permeabilität des Protoplasmas, mit der sich viele Tausende von Arbeiten beschäftigen, ist die Durchlässigkeit der Zellwand verhältnismäßig wenig erforscht (vergleiche die letzte Sammeldarstellung von BRAUNER im „Handbuch der Pflanzenphysiologie", 1956). Zumal in der Tränktechnik des Holzschutzes überwiegen rein empirische und handwerkliche Untersuchungen. Um die theoretischen Grundlagen der Tränktechnik zu klären, regte der erste Verf. seine letzte Tharandter Doktorandin, Frau U. HARTMANN-DICK, an, die Durchlässigkeit des Holzes gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln und gelösten Stoffen, in Anlehnung an die Erfahrungen der Protoplasmatik, in möglichst einfachen Modellversuchen zu prüfen. Sie wählte hierfür die *radiale* Durchlässigkeit 2—3 mm starker Scheibchen von 20 mm Durchmesser, durch welche die Lösungen unter 2 atm Druck gepreßt wurden. Sie fand u. a. Unterschiede von mehreren Zehnerpotenzen in der Durchlässigkeit von Splint- und Kernholz und eine deutliche Beeinflußbarkeit der Durchlässigkeit durch Ionen (lyotrope Reihe) und organische Lösungsmittel.

Es schien wünschenswert, die Erfahrungen von HARTMANN-DICK durch Versuche über die *axiale* Durchlässigkeit zu ergänzen, nicht nur, weil axiale Tränkverfahren (Saftverdrängungsverfahren, Lebendtränkung) neben radialen eine beträchtliche Rolle spielen (MAHLKE, TROSCHEL u. LIESE 1950), sondern vor allem, weil es sich dabei um den normalen Weg des natürlichen Saftstromes handelt, von solchen Untersuchungen also auch neue Einblicke in die Physiologie des Transpirationsstromes zu erwarten waren. Nach Vorversuchen im Rahmen einer Zulassungsarbeit zur Prüfung für das Höhere Lehramt (INGE SCHMIDT 1954)

* Herrn Prof. Dr. O. RENNER zum 75. Geburtstag gewidmet.

** I. Teil einer Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

übernahm der zweite Verf. im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Holzforschung" der Deutschen Forschungsgemeinschaft diese dankbare Aufgabe.

Die Untersuchungen liefen insofern anders als geplant, als sich bei Nadelhölzern die als Bezugssystem vorgesehene *Wasserleitfähigkeit* als *überaus variabel* erwies. Die Ursache für die zunächst schlechte Reproduzierbarkeit der Werte konnte im Verhalten der Hoftüpfel gefunden werden, deren Verschluß — anatomisch oft beschrieben — bisher physiologisch kaum faßbar war. Die hier vorgelegten Untersuchungen konzentrieren sich ganz auf die Klärung dieses Zusammenhanges. Erst damit scheinen die Voraussetzungen für die Erfassung von Durchlässigkeitsunterschieden gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln und gelösten Stoffen geschaffen, mit denen sich weitere Mitteilungen beschäftigen sollen.

Für die jahrelange Unterstützung der Untersuchungen sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft geziemend gedankt.

A. Vorversuche und Versuchsanordnung

1. Prüfkörper

a) Allgemeines. Die Technologie des Holzes (Kollmann 1951, 1955) verdankt ihre entscheidenden Fortschritte zweifellos der *„Prüfkörper"-Methode:* An sorgfältig gewählten Ausschnitten kleinerer Abmessungen lassen sich Festigkeitseigenschaften aller Art, Pilz- und Insektenresistenz und dergleichen in vielfältiger Wiederholung leichter prüfen als an ganzen Baumstämmen. Ebenso bewährt hat sich die Prüfkörpermethode bei Versuchen über die Rindenschälung (Huber 1948, Wilcox u. Mitarbeiter 1954, Gläser 1954, Zieger u. Sachsse 1955).

Auch bei den vorliegenden Untersuchungen bedienten wir uns der Prüfkörpermethode: Während Hartmann-Dick, wie eingangs erwähnt, die *radiale* Durchlässigkeit an genormten Scheibchen prüfte, ging bereits Inge Schmidt (1954) zur Verwendung meist 4 cm langer *axialer* Prüfzylinder über, eine Anordnung, die im wesentlichen auch bei den vorliegenden Untersuchungen beibehalten wurde. Für Vorversuche wurden Stücke von dünnen Stämmchen und Ästen verwendet. Diese Methodik konnte aber nicht gut beibehalten werden, da es Mühe machte, Proben stark wechselnder Durchmesser an die noch zu besprechende Apparatur anzuschließen.

Zur Vereinheitlichung der Proben wurden diese daher aus Stammscheiben in der gewünschten Form herausgeschnitten. Die zylindrischen Proben von 15 mm Durchmesser wurden mit einem Hohlbohrer möglichst faserrecht entnommen[1]. Die Proben waren in der Regel 40 mm, später nach Einsatz eines neuen Bohrers zum Teil auch 80 mm lang. Die

[1] Für die Anfertigung der zahlreichen Proben möchten wir dem Oberpräparator des Forstbotanischen Institutes, Herrn J. Hey, auch an dieser Stelle danken.

längeren Proben wurden aber nur ausnahmsweise als solche verwendet, in der Regel hingegen quer halbiert, um zwei streng vergleichbare Prüfzylinder (von je 40 mm Länge) zu erhalten. Da solche Proben naturgemäß mehrere Jahresringe umfassen, wurden für Sonderfragen Zylinder kleinerer Abmessungen gedrechselt, welche nur Früh- oder nur Spätholz enthielten (vergleiche die folgende II. Mitteilung, HUBER u. MERZ 1958).

b) Aufbewahrung der Proben. Um die möglichst frisch entnommenen Holzproben auf eine gleichmäßige Anfangsfeuchtigkeit zu bringen, wurden sie in Gefäßen mit destilliertem Wasser unter Vakuumglocken gesetzt, und diese abwechselnd dem Vakuum einer Wasserstrahlpumpe und dem normalen Luftdruck ausgesetzt. Dies wurde so lange fortgesetzt, bis alle Proben auch im Vakuum am Boden der Gefäße liegenblieben. Das ist bei Holz der hier verwendeten Rohwichten der Fall, wenn weitgehende Fasersättigung und Füllung aller Zellhohlräume mit Wasser erreicht ist.

Nun konnte aber nicht für jeden einzelnen Versuch jedes Probeklötzchen frisch hergestellt werden, sondern es mußte stets eine größere Zahl von Proben gleichzeitig angefertigt und bis zur Verwendung in geeigneter Weise vorrätig gehalten werden. Um eine Verpilzung einerseits und eine chemische Veränderung der Proben andererseits zu vermeiden, wurden die Holzklötzchen in großen Standgläsern mit destilliertem Wasser aufbewahrt und reichlich Kristalle von *Thymol* in das Gefäß gegeben. Dadurch wurde die Atmosphäre in den gut verschlossenen Gläsern mit Thymoldämpfen gesättigt, ohne daß das kaum wasserlösliche Thymol die Proben selbst beeinflußt hätte (wie das bei den von HARTMANN-DICK und I. SCHMIDT verwendeten Formaldehydlösungen wahrscheinlich der Fall war). Durch die Thymol-Zugabe konnte bei allen Nadelholzproben eine Verpilzung verhindert werden[1]. Auch bei 50—90° „eingeweckte" Proben hielten sich jahrelang einwandfrei. Um die bei diesen hohen Temperaturen etwa möglichen Veränderungen der Holzproben durch Quellungsvorgänge zu vermeiden, verdient auch das von HARRIS (1954) angegebene Verfahren der feuchten Aufbewahrung der Holzproben bei 1—2° Beachtung.

2. Orientierende Durchsaugversuche mit Farbstofflösungen

Privatdozent Dr. ZIEGLER hatte 1956 in unserm Institut zur Gewinnung von Gefäßsaft im Rahmen seiner Habilitationsschrift eine Versuchsanordnung entwickelt, die auch wir für Vorversuche verwenden konnten: Die zylindrischen Holzproben wurden in mehrere Schlauchstückchen so dicht eingesetzt, daß das Ganze als Stopfen auf eine Saugflasche aufgesetzt werden konnte; während dann die Saugflasche durch eine Wasserstrahlpumpe evakuiert wurde, konnte man der Holzprobe von oben Farbstofflösung zuführen.

Diese Versuchsanordnung gab für die weitere Arbeit wertvolle Aufschlüsse über die Filtrationswege. Zum Beispiel beschränkte sich bei Robinie in den älteren Jahresringen die Leitung auf das Spätholz, weil das Frühholz bereits von Thyllen verschlossen war; bei Lärche hört an der Splint-/Kerngrenze die Farbstoff-Filtration unvermittelt auf; im Splintholz der Nadelhölzer färbte sich stets stark bevorzugt das Frühholz, welches bei Kurzversuchen allein gefärbt wurde; bei Schrägfaserigkeit ergaben nur die durchlaufenden Bahnen eine Filtration der Farblösung, während blind endende Bahnen nicht infiltriert wurden. Besonders bei Buchenholz betrug aus diesem Grunde der wirklich leitende Querschnitt oft nur

[1] Nur die Proben von Robinie, Esche und Waldrebe *(Clematis)* verpilzten auch bei Thymol-Zugabe und konnten nicht auf diese Weise für die Versuche aufbewahrt werden.

50—70% des gesamten. Bei der Berechnung absoluter Filtrationswerte müßte man diesem Umstande Rechnung tragen; wir haben es aber bei den Hauptversuchen vorgezogen, auf eine rechnerische Korrektur zu verzichten und schrägfaserige Proben von der Auswertung auszuschließen. Zu diesem Zwecke wurden jeweils nach Abschluß der nunmehr zu schildernden Druckversuche durch die Holzproben mit Hilfe der beschriebenen Versuchsanordnung Farbstofflösungen zur Markierung der benützten Bahnen durchgesogen.

3. Endgültige Versuchsanordnung (Druckversuche)

Bei den beschriebenen Durchsaugversuchen hätten sich fortlaufende quantitative Messungen ziemlich schwierig gestaltet; deshalb wurde bei den endgültigen Versuchen vorwiegend destilliertes Wasser *unter Druck* durch die Prüfkörper filtriert und die ablaufende Menge volumetrisch bestimmt.

Für Absolutmessungen empfiehlt es sich, während der Filtrationsdauer den *Druck konstant* zu halten. Am besten benützt man dafür Abklärflaschen, deren großer Flüssigkeitsspiegel während eines Versuches nur unbedeutend sinkt. Die *Druckhöhe* wurde zwischen 0 und 10 Meter Wasserdruck variiert, was bei 4 cm Probenlänge Druckgefällen bis zu 25 atm/m entspricht. Bei den höchsten Drucken stand das Vorratsgefäß im Dachgeschoß des Institutes, während die Prüfkörper im Erdgeschoß an die durch das Treppenhaus geführten Schlauchleitungen angeschlossen waren.

Schwieriger ist die Einhaltung *konstanter niedriger Drucke*, wie sie die im Abschnitt B 3 behandelten Fragen verlangen. Dazu wurde das Prinzip der Mariotteschen Flasche angewendet (Abb. 1). Die Druckhöhe ist dabei stets über der unteren Schnittfläche der Holzprobe zu rechnen, was zahlenmäßig natürlich nur bei den kleinsten Drucken ins Gewicht fällt. Druckgefälle unter 0,1 atm/m können überhaupt nicht bei senkrechter, sondern nur bei schiefer bis waagerechter Stellung der Prüfkörper hergestellt werden (vergleiche Abschnitt B 3).

Zur *Abdichtung der Proben* bewährte sich ein ziemlich dickwandiger Polyvinylchlorid-Schlauch. Dieses neuartige Material kann durch Eintauchen in sehr heißes Wasser schmiegsam gemacht werden. In diesem Zustand wird die Holzprobe in den Schlauch eingesetzt. In noch warmem Zustand schmiegt sich das Plastikmaterial gut an die kleinen Unebenheiten der Holzprobe an und bietet im abgekühlten Zustand einen festen Abschluß. Dazu kommt noch der große Vorteil, daß dieses Material glasklar durchsichtig ist, und damit während der ganzen Versuchsdauer einen Einblick in die unmittelbar oberhalb der Probe befindliche Flüssigkeitskammer bietet.

Das ist besonders wichtig zur Überwachung der *Luftfreiheit* des Systems. Aus dem gesamten Glasrohr- und Schlauchsystem muß alle Luft sorgfältig entfernt werden, da sonst bei allen Versuchen mit Nadelhölzern ein „Luftpolster" in den obersten Tracheiden das Eindringen der Flüssigkeit verhindert und dadurch die Meßergebnisse beträchtlich stört. Die Entlüftung des ganzen Systems wurde durch Einschalten von Y-Stücken aus Glasrohr in die Schlauchleitungen erreicht (Abb. 1). An den freien Enden dieser Dreiwegstücke waren kurze Gummischläuche befestigt.

Aus diesen kurzen Stutzen konnte bei der Füllung des Schlauchsystems mit Flüssigkeit die Luft entweichen. Sobald aus all diesen Stutzen ebenfalls luftfreie Flüssigkeit ausströmte, wurden die Schlauchstücke mit Quetschhähnen verschlossen. Je größere Durchmesser für die Schläuche und Glasröhren gewählt wurden, um so leichter konnte die völlige Luftfreiheit der Apparatur erzielt werden.

Die *Bestimmung der durchgelaufenen Flüssigkeitsmengen* erfolgte je nach der Filtrationsgeschwindigkeit in untergestellten Meßzylindern (mit kleinen Trichtern) oder in Büretten (Abb. 1).

Zur *Berechnung der Filtrations-Geschwindigkeiten* wurden die in der Zeiteinheit (Stunde = h) aufgefangenen Flüssigkeitsmengen (cm^3) bezogen auf die wirklich leitende Querschnittsfläche der Holzprobe (in cm^2). Daraus ergab sich für alle in dieser Arbeit genannten Filtrationsgeschwindigkeiten die Dimension:

$$\frac{cm^3}{cm^2 \times h} = cm/h.$$

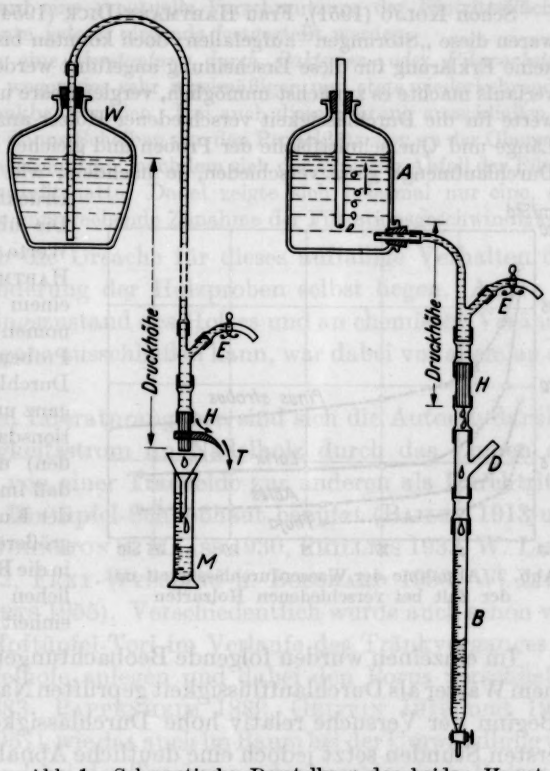


Abb. 1. Schematische Darstellung der beiden Hauptversuchsanordnungen: links für hohe Drucke, rechts für niedrige, sehr konstante Drucke. *A* Abklärflasche mit „Luftrohr" = Mariottesche Flasche, *B* Bürette, *D* Luftdruckausgleichsstutzen für Bürette, *E* Entlüftungsstutzen mit Gummischlauch und Quetschhahn, *H* zylindrische Holzprobe, *M* Meßzylinder mit Trichter, *T* Tropfenabweiser für evtl. Undichtigkeiten, *W* Wasserballon mit Heber

Alle angewendeten *Drucke* wurden von Wasserdruckhöhe (cm) umgerechnet in Atmosphären, und diese wurden zu der Länge der Holzprobe (ausgedrückt in Meter) in Beziehung gesetzt. Das ergab für alle angegebenen Drucke die Dimension *atm/m*.

B. Hauptversuche

1. Zeitliche Abnahme der Durchlässigkeit

Schon während der Vorversuche fiel auf, *daß bei allen Versuchen mit Nadelholz die axiale Durchlässigkeit mit der Zeit ständig abnimmt.* Dies konnte weder durch Änderungen des Druckes bedingt sein, weil diese

Erscheinung selbst bei konstantem Druck zu beobachten war, noch konnte es mit der Temperatur zusammenhängen. Die Ursache für diese Erscheinung mußte vielmehr auf einer Veränderung im Holz selbst, während des Filtrationsversuches, beruhen.

Schon KOLJO (1951), Frau HARTMANN-DICK (1954) und INGE SCHMIDT (1954) waren diese „Störungen" aufgefallen; doch konnten bisher nur Vermutungen, aber keine Erklärung für diese Erscheinung angeführt werden. Diese Art des Versuchsverlaufs machte es zunächst unmöglich, vergleichbare und reproduzierbare Absolutwerte für die Durchlässigkeit verschiedener Hölzer anzugeben. Selbst bei gleicher Länge und Querschnittfläche der Proben und gleicher Druckhöhe war nämlich die Durchlaufmenge ganz verschieden, je nachdem, wie lange die Probe schon der Druckfiltration ausgesetzt war. Die überaus große Streuung der Werte in den Ergebnissen von HARTMANN-DICK muß wohl zu einem großen Teil auf dieses Phänomen zurückgeführt werden. Die Proben wurden nämlich, je nach Durchlässigkeit und Dicke, einer ganz unterschiedlich langen Filtrationsdauer (ein bis mehrere Stunden) unterworfen, was bedeutet, daß im ersten Falle nur der Gipfel der Kurve, im zweiten jedoch zum größeren Teil ihr absteigender Ast in die Berechnung der durchschnittlichen Durchlässigkeit pro Zeiteinheit einbezogen wurde.

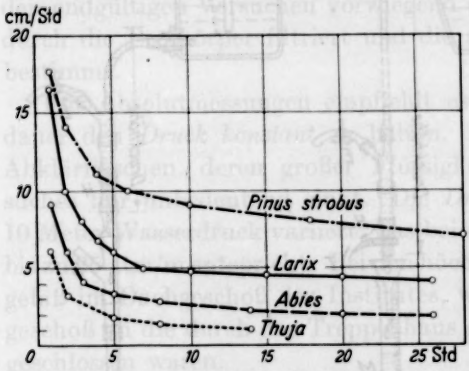


Abb. 2. Abnahme der Wasserdurchlässigkeit mit der Zeit bei verschiedenen Holzarten

Im einzelnen wurden folgende Beobachtungen gemacht: Alle mit reinem Wasser als Durchlaufflüssigkeit geprüften Nadelholzproben zeigten zu Beginn der Versuche relativ hohe Durchlässigkeit; schon während der ersten Stunden setzt jedoch eine deutliche Abnahme ein. Diese Abnahme wird zwar mit der Zeit langsamer, ist jedoch durch Wochen weiter zu beobachten (Abb. 2). Erst nach 2—3 Monaten wird ein konstanter Endwert der Durchlässigkeit erreicht. Die dann noch auftretenden geringfügigen Schwankungen folgen den vorhandenen Temperaturschwankungen und lassen sich aus den Viscositätsänderungen des Wassers erklären.

Die Erscheinung war bei allen untersuchten Nadelhölzern in gleicher Weise zu beobachten: bei Lärche, Douglasie, Tanne, Kiefer, Weymouthskiefer und Thuja. Zwar waren qualitative Unterschiede zwischen den einzelnen Holzarten erkennbar, doch verliefen alle Kurven im gleichen Sinne. Die Erscheinung der Abnahme der Filtrationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Druckeinwirkung war auch bei Kernholz zu beobachten; nähere Angaben darüber bringt die II. Mitteilung (HUBER u. MERZ 1958).

Selbstverständlich tauchte schon sehr bald die Frage nach der Ursache dieser Erscheinung auf. Wegen des sehr regelmäßigen Verlaufs der Kurven und den, nach

den ersten Stunden mit fast mathematischer Genauigkeit voraussagbaren weiteren Filtrationswerten, konnte man wohl kaum mit *Verschmutzung* als Ursache für diesen Kurvenverlauf rechnen. Trotzdem wurde hierauf geachtet und sorgfältig geprüft. Die Gefäße für die Tränkflüssigkeiten wurden staubdicht verschlossen, es wurden Filter eingesetzt, und beim Herausnehmen der Proben nach Beendigung des einzelnen Versuches wurde auf eine eventuelle Verschmutzung der Eintrittsflächen geachtet; eine solche konnte jedoch nirgends festgestellt werden.

Man konnte auch an eine *Verstopfung durch Bakterien- oder Pilzwachstum* denken, obwohl auch das wegen des sehr regelmäßigen und stets wiederkehrenden Kurvenverlaufes kaum denkbar erschien. Um auch diese Störung ausschließen zu können, wurden mehrfach dünne Scheiben von den Probeklötzchen an der Oberseite und an der Unterseite abgeschnitten, nachdem sich der typische Abfall der Filtrationsgeschwindigkeit eingestellt hatte. Dabei zeigte sich jedesmal nur eine, der Verkürzung der Holzprobe entsprechende Zunahme der Filtrationsgeschwindigkeit.

Es mußte demnach die Ursache für dieses auffällige Verhalten der Proben in einer Veränderung der Holzproben selbst liegen. Außer an Änderungen im Quellungszustand des Holzes und an chemische Veränderungen, die man nicht ganz ausschließen kann, war dabei vor allem an die *Hoftüpfel* zu denken.

In den vorhandenen Literaturangaben sind sich die Autoren darüber einig, daß der Flüssigkeitsstrom im Nadelholz durch das Lumen der Tracheiden geht, und von einer Tracheide zur anderen als Durchtrittspforten die Poren der Hoftüpfel-Schließhaut benützt (Bailey 1913 und 1916, Frenzel 1929, Johnston u. Maass 1930, Phillips 1933, W. Liese u. Fahnenbrock 1952, Frey-Wyssling u. Bosshard 1953, W. Liese u. Johann 1954b, Marts 1955). Verschiedentlich wurde auch schon vermutet, daß sich die Hoftüpfel-Tori im Verlaufe des Tränkvorganges an einer Seite dem Tüpfelhofe anlegen und dabei den Porus verschließen könnten (Russow 1883, Pappenheim 1889, Griffin 1919 und 1924, Koljo 1951, Bailey 1957), wie das auch im Baum bei der Umwandlung von Splint- in Kernholz und bei der Trocknung des geschlagenen Holzes im Splintholz vor sich geht (R. Hartig 1883, Strasburger 1891, Haberlandt 1924, Renner 1925, Büsgen u. Münch 1927, Phillips 1933, W. Liese 1951, Harris 1954, Trendelenburg u. Mayer-Wegelin 1955, W. Liese 1956).

Darnach könnte es sich bei der beobachteten Erscheinung um eine *Verlagerung der Tori in den Hoftüpfeln* und damit um einen teilweisen oder vollständigen Verschluß einzelner oder vieler Tüpfel handeln. Durch dauernden einseitigen Druck würden so nach und nach die „Ventilklappen" der Hoftüpfel in eine Richtung gedrückt und verschlossen. Die folgenden Versuche erbringen den Beweis für diese Annahme.

2. Umkehrversuche zum Nachweis eines reversiblen Hoftüpfelverschlusses

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde untersucht, welchen Einfluß eine *Umkehr der Durchflußrichtung* auf die Wasserdurchlässigkeit hat.

Entweder wurden die Probezylinder gedreht und dann wieder dem gleichen Druck unterworfen, oder es wurde einfach der Druck auf der einen Seite aufgehoben, und von der anderen Seite her wurde die gleiche Flüssigkeit in die Holzprobe gedrückt. Beruhte der Rückgang der Wasserleitfähigkeit auf (reversiblem) Hoftüpfelverschluß, so sollten bei Umkehr der Strömungsrichtung die Tori wenigstens zum Teil wieder frei werden und die Leitfähigkeit ansteigen; nach einiger Zeit müßte sich das Spiel in entgegengesetzter Richtung wiederholen, die Tori sich der anderen Ausmündungsöffnung anlegen und die Leitfähigkeit erneut sinken.

Das Ergebnis der Versuche entsprach auf Anhieb und ausnahmslos der Erwartung: *Unmittelbar nach der Umkehr der Durchlaufrichtung stieg die Durchlässigkeit auf ein Vielfaches des zuletzt in der ursprünglichen Richtung gefundenen Wertes an* (Abb. 3 und 4). Dieser wichtige Befund wurde bereits 1956 in den „Naturwissenschaften" als „Kurze Originalmitteilung" veröffentlicht (HUBER u. MERZ).

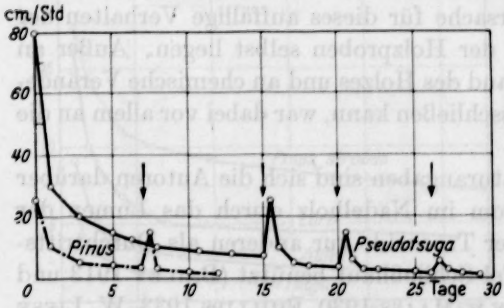


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der absoluten Wasserdurchlässigkeit (cm/h) bei wiederholter Umkehr der Holzproben (Pfeile!)

Der Durchlässigkeitsanstieg nach der Umkehr war um so höher, je kürzer der Holzzylinder war. Außerdem war der Anstieg der Durchlässigkeit um so höher, je niedriger der angewendete Druck war: Bei Drucken von 0,3—1 atm/m konnte für die ersten Minuten bis zu einer Stunde eine Durchlässigkeit erreicht werden, die 70—100% des Anfangswertes in der ursprünglichen Richtung betrug; bei Drucken von 2—10 atm/m wurden nach der Umkehrung der Durchlaufrichtung am häufigsten 10—50% der Anfangsdurchlässigkeit beobachtet (Abb. 4).

In allen Fällen wurde aber durch die Umkehrung eine eindeutige Steigerung der Durchlässigkeit erzielt, die weit jenseits aller Versuchsfehler lag. Gegenüber dem Endwert der Durchlässigkeit in der anfänglichen Durchlaufrichtung wurden nämlich zu Beginn des Durchlaufes in der Umkehrrichtung durchwegs Steigerungen auf das 2—5fache, häufig aber sogar auf das 10—15fache erzielt. Diese Steigerung war um so geringer, je länger die Holzproben waren.

Daß in den meisten Fällen nicht wieder die volle Durchlässigkeit wie bei den Anfangswerten erreicht wurde, kann man wohl wie folgt deuten: Während sich die Flüssigkeit in der neuen Durchlaufrichtung den Weg durch das Holz bahnt, werden die Hoftüpfel nicht nur von der Wand des Tüpfelhofes weg in die Mittelstellung gerückt, sondern alsbald — und zwar besonders bei hohen Drucken — auf die

andere Seite und dem jenseitigen Porus angedrückt. So entsteht ein neuer Tüpfelverschluß, der den weiteren Durchlässigkeitsanstieg abbremst. Bei längeren Holzproben wird dieser Vorgang am oberen Ende bereits eintreten, ehe am unteren Ende die letzten ursprünglichen Tüpfelverschlüsse gelöst sind. Bei niedrigen Drucken erfolgt dieser Vorgang des neuerlichen Tüpfelverschlusses so langsam, daß zunächst für einige Minuten bis zu einer Stunde die Durchlässigkeit fast auf den ursprünglichen Wert ansteigt, ehe auch hier durch neuerlichen Verschluß der Tüpfel eine Verlangsamung des Durchlaufes eintritt.

Bemerkenswert ist noch folgende Beobachtungstatsache: Wurde zunächst mit einem hohen Druck ein einseitiger Tüpfelverschluß hervorgerufen, so kann dieser zwar durch einen ebenso hohen oder noch höheren Druck von der Gegenseite, nicht aber durch niedrige Drucke wieder aufgehoben werden. Die Durchlässigkeit steigt in diesen Fällen nach der Umkehrung der Proben nicht an, sondern sinkt im Gegenteil rasch weiter ab und erreicht bald den Wert 0, sofern nach der Umkehrung überhaupt ein Flüssigkeitsaustritt beobachtet werden kann. Ebenso sinkt die Durchlässigkeit sehr stark ab oder erreicht auch hier den Wert 0, wenn man *ohne* Umkehrung der Holzprobe den Druck etwa von 3 atm/m nach einigen Tagen auf $^1/_5$ bis $^1/_{10}$ dieses Druckes herabsetzt; dagegen ergeben diese Drucke (0,3 bis 0,6 atm/m) noch eine gute Durchlässigkeit, wenn sie von Beginn des Versuches an, also vor dem Eintreten von Hoftüpfelverschlüssen, angewendet werden.

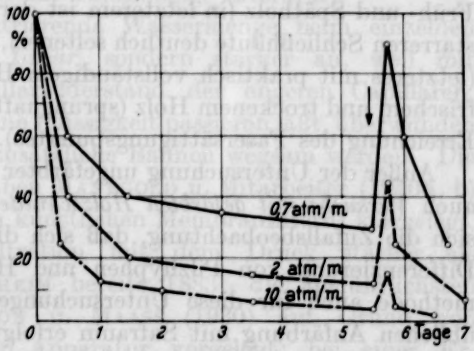


Abb. 4. Zeitlicher Ablauf der relativen Wasserdurchlässigkeit, bezogen auf die Anfangsdurchlässigkeit (= 100 %), für Lärchensplintholz bei verschiedenen Drucken

Im allgemeinen haben sich diese beschriebenen *Umkehrversuche* an ein und derselben Holzprobe *mehrmals hintereinander* ausführen lassen. Mit jedem neuerlichen Wechsel der Durchlaufrichtung trat ein neuerlicher Anstieg der Durchlässigkeit ein, welchem jeweils nach einigen Stunden durch neuerlichen Tüpfelverschluß eine Verlangsamung folgte (Abb. 3). Bei den meisten Versuchen wurde dabei ein Nachlassen der Wirksamkeit der Umkehr der Durchlaufrichtung festgestellt. Es kann nicht entschieden werden, ob dies auf eine Art „Erschlaffung" der Haltefäden der Tori in den Hoftüpfeln zurückzuführen ist, oder ob, als Folge der mehrmaligen Änderungen der Durchflußrichtung, eine gewisse „Verwirrung" unter den Hoftüpfeln aufgetreten ist, indem zahlreiche Tori entweder auf der einen oder auf der anderen Seite der Tüpfelhöfe „hängen" geblieben sind.

3. Anatomische Untersuchungen

Zur Prüfung der Richtigkeit der Hypothese, daß durch diese Druckwirkungen eine künstliche Verlagerung der Tori in den Hoftüpfeln herbeigeführt wird, wurden auch anatomische Untersuchungen ausgeführt. Dazu wurden nach den üblichen Methoden tangentiale Längsschnitte durch die Holzzylinder angefertigt, nachdem vorher die Flüssigkeitseintrittsfläche durch eine besondere Kerbe markiert worden war. Im übrigen diente die Methodik von Phillips (1933) und Harris (1954) als Vorbild, welche die Stellung der Tori in hunderten bis tausenden von Fällen auszählten. Diese hatten klare Unterschiede festgestellt zwischen Früh- und Spätholz (in letzterem ist der Hoftüpfelverschluß wegen der starreren Schließhäute deutlich seltener), zwischen Splint- und Kernholz (letzteres mit praktisch vollständigem Hoftüpfelverschluß), sowie saftfrischem und trockenem Holz (sprunghafte Zunahme der Verschlüsse bei Erreichung des Fasersättigungspunktes).

Außer der Untersuchung ungefärbter Präparate wurden gelegentlich auch *Versuche mit gefärbten Holzschnitten* unternommen. Dabei ergab sich die Zufallsbeobachtung, daß sich die von Cartwright (1929) zur Differenzierung von Pilzhyphen und Holzgewebe angegebene Färbemethode auch für diese Untersuchungen sehr gut eignet. Nach der üblichen Anfärbung mit Safranin erfolgt hier eine Doppelfärbung mit einer Pikrinsäure-Anilinblau-Lösung. Das Anilinblau wird aber nicht nur in Pilzhyphen gespeichert und läßt diese deutlich erkennen, sondern es wird auch in den Tori der Hoftüpfel festgehalten und läßt diese daher gegenüber den rotgefärbten Wänden der Tracheiden und damit gegenüber den Tüpfelhöfen deutlich hervortreten.

Bei Stichproben an so gefärbten Präparaten wurde festgestellt, daß die Tori in den Hoftüpfeln der Tracheidenenden tatsächlich durch den Druck in einer Richtung verlagert worden waren. In den Hoftüpfeln der Tracheiden-Längswände dagegen waren die Tori unregelmäßig nach der einen oder anderen Seite verlagert. Wahrscheinlich werden die Tori immer nach jener Tracheide hingezogen werden, in welcher die Flüssigkeit schneller strömt; und Unterschiede in der Durchströmungsgeschwindigkeit benachbarter Tracheiden sind wohl mit Sicherheit anzunehmen.

Die Zurückführung des Durchlässigkeitsrückganges auf Hoftüpfelverschluß ist somit physiologisch und anatomisch gesichert.

4. Abhängigkeit der Filtrationsgeschwindigkeit vom Druck

Die axiale Filtration durch Holz weicht in zweifacher Hinsicht von den einfachen Modellvorstellungen des Hagen-Poiseuilleschen Gesetzes über die Strömung von Flüssigkeiten in Capillaren ab:

1. in der *absoluten* Höhe, weil es sich bei den Gefäßbahnen nicht immer um kreisrunde, glatte Capillaren, sondern oft anders geformte

(polygonale) und innen rauhe (Leisten, Warzen) Röhrensysteme handelt (HARADA 1953, W. LIESE u. HARTMANN-FAHNENBROCK 1953, W. LIESE u. JOHANN 1954a). Die größten Abweichungen aber bringt das Querwandhindernis der Tracheidenhölzer: Während die Wasserleitfähigkeit von Lianen und Wurzelhölzern die nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz ermittelte theoretische Leitfähigkeit praktisch erreicht, ergeben sich bei anderen Hölzern empirisch kleinere Leitfähigkeiten bis herab zu wenigen Prozent der theoretischen bei Nadelhölzern (Näheres in der Sammeldarstellung von HUBER im „Handbuch der Pflanzenphysiologie", 1956a; hier auch die einschlägige Literatur).

2. steigt aber auch die filtrierende Wassermenge beim einzelnen Objekt *mit dem Druck nicht linear*, sondern stärker an, weil mit wachsendem Druck der Capillarwiderstand der engeren Capillaren, welcher zunächst überhaupt keine Flüssigkeit passieren läßt, überwunden wird und für die Strömung zusätzliche Bahnen wegsam werden. Die Theorie dieser Erscheinung haben MANEGOLD u. Mitarbeiter (1940a, b) rechnerisch und empirisch (an künstlichen Membranfiltern) klargelegt. Daß auch im Holz die Filtration mit dem Druck stärker als linear ansteigt, fand PAPPENHEIM bereits 1883; die ausführlichsten Zahlenbelege haben JOHNSTON u. MAASS (1930) auf Grund von Versuchen mit einer modernen Apparatur vorgelegt: bei einer Erhöhung des Druckes auf das Doppelte stieg die Durchlässigkeit unter Umständen auf das 3—5fache an. Ähnliches fand KOLJO (1951), der allerdings nicht den Druck, sondern die Länge der Prüfkörper variierte.

Unsere eigenen Untersuchungen galten nicht so sehr diesen schon länger bekannten Erscheinungen, sondern speziell der *Druckabhängigkeit des Hoftüpfelverschlusses*, insbesondere der Frage, ob es für diesen eine untere Druckschwelle gibt. Das Ergebnis der einschlägigen Versuche mit Lärchensplintholz ist in Abb. 5 im logarithmischen Netz dargestellt, da Druck (Abszisse) wie Filtrationsgeschwindigkeit (Ordinate) über mehr als zwei Zehnerpotenzen schwanken. Bei einer solchen doppelt logarithmischen Darstellungsweise würde eine lineare Beziehung zwischen Druck und Filtration wiederum in einer Geraden zum Ausdruck kommen. In der ersten Versuchsstunde sind die Abweichungen von dieser Proportionalität gering; in Übereinstimmung mit den eingangs erwähnten Arbeiten zeigen die Abweichungen die Tendenz einer überproportional erhöhten Durchlässigkeit bei hohen Drucken.

Würde nun die zeitliche Abnahme der Durchlässigkeit bei allen Drucken gleichmäßig erfolgen, so müßte sich das im doppelt logarithmischen Netz in einer Parallelverschiebung der Durchlässigkeitskurve der ersten Stunde ausdrücken. Tatsächlich aber divergieren die Kurven der 1., 2. und 24. Stunde und des 30. Tages stark nach rechts, d. h. *die*

Filtration sinkt bei höheren Drucken mit der Zeit nicht nur absolut, sondern auch relativ weit stärker als bei niederen Drucken. Das geht so weit, daß die anfangs gegen die Abszisse leicht konvexen Kurven in einen gegen die Abszisse konkaven Kurvenverlauf übergehen. Während die Filtration anfangs mit dem Druck stärker als linear ansteigt, steigt sie nun schwächer als linear. *Die Durchlässigkeitsunterschiede zwischen verschiedenen Drucken klingen allmählich ab: Zwischen 1 und 20 atm/m betragen sie in der ersten Stunde 1:125, in der zweiten Stunde 1:37.5, in der 24. Stunde 1:12.7, am 30. Tage aber nur noch 1:3.2.*

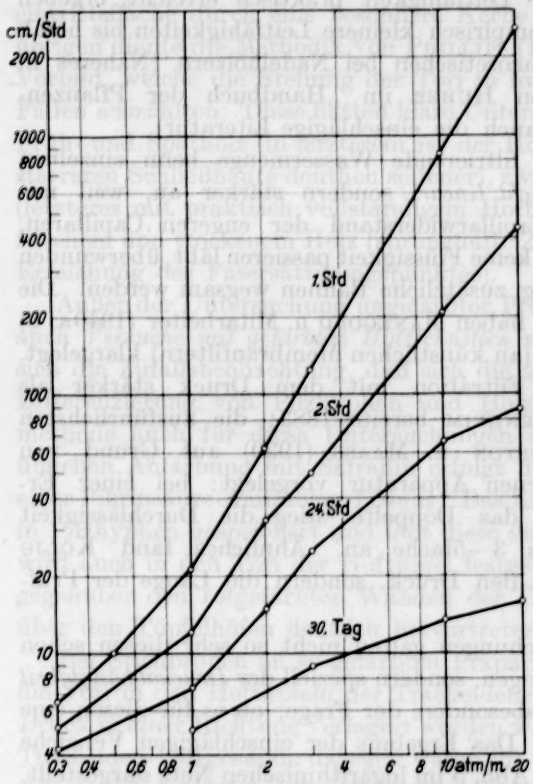


Abb. 5. Abhängigkeit der Wasserdurchlässigkeit von Lärchensplintholz (Ordinate) vom Druck (Abszisse) im doppelt logarithmischen Netz; Mit der Zeit (Parameter) nimmt die Durchlässigkeit bei hohen Drucken rascher ab als bei niederen

Darüber hinaus wurden in Abb. 6 die *Relativwerte der Durchlässigkeitsabnahme*, verglichen mit den Werten der ersten Stunde (= 100%), zur Darstellung gebracht. Wegen der Erstreckung über mehr als zwei Zehnerpotenzen in beiden Achsen wurde auch hierfür das doppelt logarithmische Netz als Maßstab verwendet, allerdings hier die Zeit als Abszisse und die verschiedenen Drucke als Parameter. Die Abbildung zeigt deutlich die starke Abnahme der Durchlässigkeit (auf weniger als 1%) im Laufe von 30 Tagen bei Anwendung von 20 atm/m und den viel geringeren Durchlässigkeitsrückgang bei der Anwendung niederer Drucke, besonders unterhalb 1 atm/m.

Das Konvergieren der Kurven nach links in Abb. 5[1] führt schon rein graphisch zur Extrapolation, daß in der Größenordnung von etwa

[1] Eine ähnliche Darstellungsweise hat BOGEN (1950, S. 75, Abb. 3) zur Darstellung des Ultrafilterprinzips bei der Semipermeabilität des Cytoplasmas benützt: Über der Malonamid-Durchlässigkeit als Abszisse konvergieren die Durchlässigkeiten für andere Stoffe in der Richtung steigender Durchlässigkeit, weil die Filterwirkung nachläßt.

0,1 atm/m der zeitliche Rückgang der Durchlässigkeit aufhört. Es ist das offenbar jener Druck, bei dem keine Verlagerung der Tori in den Hoftüpfeln mehr stattfindet. Es ist sicher kein Zufall, daß es sich dabei um die gleiche Größenordnung handelt, mit der der natürliche Saftstrom betrieben wird (HUBER 1956a, b).

Bei der physiologischen Tragweite der Annahme einer *Druckschwelle für den Hoftüpfelverschluß* wollten wir uns nicht mit dieser graphischen Extrapolation begnügen; wir versuchten vielmehr, uns auch empirisch an diese Druckschwelle heranzutasten. Diese Versuche sind deswegen nicht einfach, weil bei so geringen Drucken (0,1—0,5 atm/m) auch nur entsprechend langsame Filtrationen und daher geringe Flüssigkeitsmengen (weniger als 1 ml/h) auftreten, was die Ablesegenauigkeit sehr beeinträchtigt. Zudem sind gerade diese Versuche gegenüber den kleinsten störenden Einflüssen besonders empfindlich. Es werden daher erst noch weitere Untersuchungen zu dieser Problemstellung mit verfeinerten Versuchsanordnungen unternommen. Aus den vorläufigen Messungen kann aber schon erkannt werden, daß *bei Anwendung der Drucke von 0,2—0,4 atm/m noch ein geringer Rückgang der Durchlässigkeit mit der Zeit* vorhanden ist, während *bei einem Druck von ungefähr 0,1 atm/m keine Änderung der Durchlässigkeit* mit den jetzigen Meßgenauigkeiten feststellbar war.

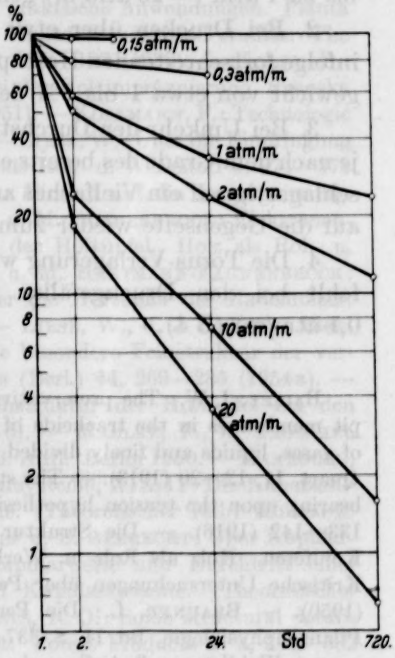


Abb. 6. Zeitliche Abnahme der relativen Wasserdurchlässigkeit von Lärchensplintholz, bezogen auf den Anfangswert (= 100 %) bei verschiedenen Drucken (Parameter)

Bei den niedrigsten geprüften Drucken von 0,1 atm/m müssen die Holzproben in horizontaler Lage dem hydrostatischen Druck unterworfen werden, da hier nur je 1 cm Wassersäule pro 1 cm Probenlänge über dem Mittelpunkt der Austrittsfläche als hydrostatischer Druck wirken darf. Diese Versuchsanordnung entspricht damit ungefähr derjenigen des Hartigschen „Tropfenversuchs" (HARTIG R. 1891, S. 214). Auch das Ergebnis dieser Versuche, daß nämlich Nadelholz selbst bei diesen niedrigen Drucken noch Wasser durchtreten läßt, stimmt mit R. HARTIGs Angaben überein.

Zusammenfassung

1. Die axiale Wasserleitfähigkeit von Nadelhölzern wurde an wassergesättigten zylindrischen Prüfkörpern (15 mm Durchmesser, 40 mm Länge), welche aus Stammscheiben herausgebohrt wurden, bei Drucken bis zu 1 atm (= 25 atm/m) gemessen (Abschnitt A 1 und 3).

2. Bei Drucken über etwa 0,5 atm/m sinkt die Wasserleitfähigkeit infolge fortschreitenden Hoftüpfelverschlusses stetig bis zu einem Gleichgewicht von etwa 1 bis 2% des Anfangswertes (B 1).

3. Bei Umkehr der Durchströmungsrichtung steigt die Leitfähigkeit, je nach dem Grade des bereits erzielten einseitigen Hoftüpfelverschlusses, schlagartig auf ein Vielfaches an, und sinkt mit der Umlagerung der Tori auf die Gegenseite wieder zum gleichen Endwert (B 2).

4. Die Torus-Verlagerung wird durch hohe Drucke beschleunigt und fehlt bei den Druckgefällen des natürlichen Saftstromes (bei etwa 0,1 atm/m) (B 4).

Literatur

Bailey, I. W.: The preservative treatment of wood. II. The structure of the pit membranes in the tracheids of conifers and their relation to the penetration of gases, liquids and finely divided solids into green and seasoned wood. Forestry Quart. **11**, 12—20 (1913). — The structure of the bordered pits of conifers and its bearing upon the tension hypothesis of the ascent of sap in plants. Bot. Gaz. **62**, 133—142 (1916). — Die Struktur der Tüpfelmembran bei den Tracheiden der Koniferen. Holz als Roh- u. Werkstoff **15**, 210—213 (1957). — Bogen, H. J.: Kritische Untersuchungen über Permeabilitätsreihen. Planta (Berl.) **38**, 65—90 (1950). — Brauner, L.: Die Permeabilität der Zellwand. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 337—357. 1956. — Büsgen, M.: Bau und Leben unserer Waldbäume, 3. Aufl. neubearb. v. E. Münch. Jena 1927. — Cartwright, K. St. G.: A satisfactory method of staining fungal mycelium in wood sections. Ann. Botany **43**, 412—413 (1929). — Frenzel, P.: Über die Porengröße einiger pflanzlicher Zellmembranen. Planta (Berl.) **8**, 642—665 (1929). — Frey-Wyssling, A., u. H. H. Bosshard: Über den Feinbau der Schließhäute in den Hoftüpfeln. Holz als Roh- u. Werkstoff **11**, 417—420 (1953). — Gläser, H.: Die Messung des Schälwiderstandes beim bastfreien Entrinden des Faserholzes. Holz-Zbl. **80**, 1131—1132 (1954). — Griffin, G. J.: Bordered pits in Douglas fir: a study of the position of the torus in mountain and lowland specimens in relation to creosote penetration. J. Forestry **17**, 813—822 (1919). — Further note on the position of the tori in bordered pits in relation to penetration of preservatives. J. Forestry **22**, 82—83 (1924). — Haberlandt, G.: Physiologische Pflanzenanatomie, 6. Aufl. Leipzig 1924. — Harada, H.: Electron-microscopic investigation on the wart-like (particle) structure of conifer tracheids. J. Jap. Forestry Soc. **35**, 393—396 (1953). — Harris, J. M.: Heartwood formation in Pinus radiata (D. Don.). New Phytologist **53**, 517—524 (1954). — Hartig, R.: Zur Lehre von der Wasserbewegung in transpirierenden Pflanzen. Unters. forstb. Inst. München **3**, 47—86 (1883). — Lehrbuch der Anatomie und Physiologie der Pflanzen, unter besonderer Berücksichtigung der Forstgewächse. Berlin 1891. — Hartmann-Dick, U.: Untersuchungen über die Durchlässigkeit des Holzes bei Druckfiltration. I. Durchlässigkeit für Wasser. Forstwiss. Cbl. **73**, 40—63 (1954). — II. Durchlässigkeit für Lösungen verschiedener Art. Forstwiss. Cbl. **74**, 163—183 (1955). — Huber, B.:

Physiologie der Rindenschälung bei Fichte und Eiche. Forstwiss. Cbl. **67**, 129—164 (1948). — Die Gefäßleitung. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. III, S. 541—582. 1956a. — Die Saftströme der Pflanzen. Berlin 1956b. — HUBER, B., u. W. MERZ: Über die Wirkung des Hoftüpfelverschlusses auf die Wasserleitfähigkeit von Nadelhölzern. Naturwissenschaften **43**, 114 (1956). — Über die Bedeutung des Hoftüpfelverschlusses für die axiale Wasserleitfähigkeit von Nadelhölzern. II. Vergleichende Untersuchungen und praktische Anwendungen. Planta (Berl.) **52** (1958). — JOHNSTON, H. W., and O. MAASS: Penetration studies. The path of liquid in Jack Pine. Canad. J. Res. **3**, 140—173 (1930). — KOLJO, B.: Über die Mechanik der Flüssigkeitsbewegung bei der Holzimprägnierung. Svenska Träforskn. Inst., Trätekn. Avdel., Medd. B **25** (1951). — KOLLMANN, F.: Technologie des Holzes, 2. Aufl., 2 Bde. Berlin 1951 u. 1955. — LIESE, W.: Über die Eindringung von öligen Schutzmitteln in Fichtenholz. Holz als Roh- u. Werkstoff **9**, 374—378 (1951). — Die Feinstruktur des Holzes und ihr Einfluß auf die Imprägnierung. Holzindustrie **9**, 208—213 (1956). — LIESE, W., u. M. FAHNENBROCK: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Bau der Hoftüpfel. Holz als Roh- u. Werkstoff **10**, 197—201 (1952). — LIESE, W., u. M. HARTMANN-FAHNENBROCK: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Hoftüpfel der Nadelhölzer. Biochim. biophys. Acta **11**, 190—198 (1953). — LIESE, W., u. J. JOHANN: Elektronenmikroskopische Beobachtungen über eine besondere Feinstruktur der verholzten Zellwand bei einigen Coniferen. Planta (Berl.) **44**, 269—285 (1954a). — Experimentelle Untersuchungen über die Feinstruktur der Hoftüpfel bei den Koniferen. Naturwissenschaften **41**, 579 (1954b). — MAHLKE, F., E. TROSCHEL u. J. LIESE: Handbuch der Holzkonservierung, 3. Aufl. Berlin 1950. — MANEGOLD, E., S. KOMAGATA u. E. ALBRECHT: Über Kapillarsysteme, XIX/11: Die Kanalzahl-Verteilungskurve für polykapillare Kanalsysteme. (Theoretischer Teil.) Kolloid-Z. **93**, 166—199 (1940b). — MANEGOLD, E., K. SOLF u. E. ALBRECHT: Über Kapillarsysteme, XIX/10: Kapillarer Gegendruck, Kapillarweite und Durchtritt einer Phasengrenzfläche durch Einzelkapillaren und Kapillarsysteme. (Theoretischer Teil.) Kolloid-Z. **91**, 243—275 (1940a). — MARTS, R. O.: Some structural details of Douglasfir pit membranes by phase contrast. Forest Products J. **5**, 381—382 (1955). — PAPPENHEIM, K.: Zur Frage der Verschlußfähigkeit der Hoftüpfel im Splintholz. Ber. dtsch. bot. Ges. **7**, 2—19 (1889). — PHILLIPS, E. W. J.: Movement of the pit membrane in coniferous woods, with special reference to preservative treatment. Forestry **7**, 109—120 (1933). — RENNER, O.: Die Porenweite der Zellhäute und ihre Beziehung zum Saftsteigen. Ber. dtsch. bot. Ges. **43**, 207—211 (1925). — RUSSOW, E.: Zur Kenntnis des Holzes, insonderheit des Coniferenholzes. Bot. Cbl. **13**, 29—40, 60—68, 95—109, 134—144, 166—173 (1883). — SCHMIDT, I.: Über die Durchlässigkeit von Buchenstammholz für Wasser und Elektrolyte. Zulassungsarbeit München 1954. — STRASBURGER, E.: Histologische Beiträge, Heft III: Über den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. Jena 1891. — TRENDELENBURG, R.: Das Holz als Rohstoff, 2. Aufl., neubearbeitet von W. MAYER-WEGELIN. München 1955. — WILCOX, H., F. CZABATOR and G. GIROLAMI: Seasonal variations in bark-peeling characteristics of some adirondack pulpwood species. J. Forestry **52**, 338—342 (1954). — ZIEGER, E., u. H. SACHSSE: Messung des Schälwiderstandes. Holz-Zbl. **81**, 1323—1324 (1955). — ZIEGLER, H.: Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta (Berl.) **47**, 447—500 (1956).

Prof. Dr. BRUNO HUBER und Dr. WALTER MERZ,
Forstbotanisches Institut, München 13, Amalienstraße 52

Planta, Bd. 51, S. 660—672 (1958)

Aus dem Forstbotanischen Institut München

ÜBER DIE BEDEUTUNG DES HOFTÜPFELVERSCHLUSSES FÜR DIE AXIALE WASSERLEITFÄHIGKEIT VON NADELHÖLZERN*

II. Mitteilung

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN UND PRAKTISCHE ANWENDUNGEN

Von

BRUNO HUBER und WALTER MERZ**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. März 1958)

Einleitung

In der I. Mitteilung hatten die Verff. den zeitlichen Rückgang der axialen Wasserleitfähigkeit von Nadelhölzern und den Wiederanstieg im Umkehrversuch auf reversiblen Hoftüpfelverschluß zurückführen können. In der vorliegenden II. Mitteilung werden diese beiden Effekte bei Splint- und Kernholz, Früh- und Spätholz, Nadel- und Laubhölzern vergleichend weiter untersucht.

Vor allem aber gelang eine Beeinflussung der Vorgänge durch Chemikalien (Alkohol, Netzmittel, Sublimat), was eine praktische Anwendung in der Tränktechnik verspricht.

1. Unterschiede zwischen Splint- und Kernholz

Über Unterschiede zwischen Splint- und Kernholz hat KOLLMANN vor dem Kongreß des Internationalen Verbandes der Forstlichen Forschungsanstalten in Rom (1953) zusammenfassend berichtet. Außerdem hat die Erscheinung der Verkernung in der neuen Auflage von TRENDELENBURGS „Das Holz als Rohstoff" durch MAYER-WEGELIN (1955) eine umfassende Darstellung gefunden. Unter Hinweis auf diese Arbeiten soll in unserem Zusammenhang nur von den Unterschieden der Wasserdurchlässigkeit die Rede sein.

Schon HARTMANN-DICK (1954) hatte bei ihren Untersuchungen zwischen Splint- und Kernholz in radialer und tangentialer Richtung einen alle Erwartungen übersteigenden Durchlässigkeitsunterschied von 500 : 1 bis 1000 : 1 festgestellt. Nach eigenen Untersuchungen sind die Durchlässigkeitsunterschiede in axialer Richtung noch etwas größer.

* Herrn Prof. Dr. O. RENNER zum 75. Geburtstag gewidmet.

** II. Teil einer Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

HARTMANN-DICK gibt u. a. folgende Werte für die *radiale* Durchlässigkeit von Kiefernholz bei 500 atm/m an (umgerechnet auf cm/h):

Splint 2—4 Kern 0,003—0,006

Bei den eigenen Untersuchungen wurden für Lärchenholz bei einem Druck von 20 atm/m folgende Werte für die *axiale* Durchlässigkeit ermittelt (ebenfalls in cm/h):

Splint 2000—3000 Kern 0,5—2

Da der Hoftüpfelverschluß nach den vorangegangenen Untersuchungen nur einen Rückgang der Durchlässigkeit auf 1—2% bewirkt, muß für die weitere Verschlechterung das zusätzliche mechanische Hindernis micellarer Inkrustationen verantwortlich gemacht werden, also die Einlagerung sog. *Kernstoffe*, wie sie zuerst in Schweden untersucht wurden (ERDTMAN 1939a, 1939b; RENNERFELT 1944). Soweit sich solche besonders in organischen Lösungsmitteln teilweise wieder herauslösen ließen, wurde tatsächlich eine Verbesserung der Durchlässigkeit des Kernholzes beobachtet (W. LIESE 1951a, HARTMANN-DICK 1954).

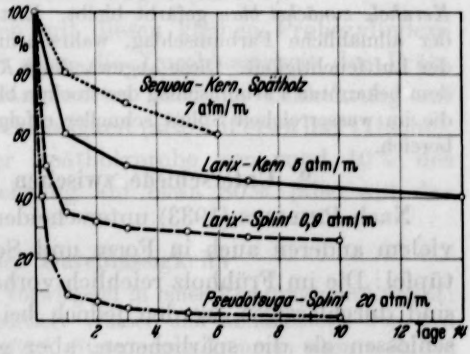


Abb. 1. Abnahme der Wasserdurchlässigkeit, bezogen auf die Anfangsdurchlässigkeit (= 100 %), für verschiedene Splint- und Kernholzproben

Trotz der absolut so geringen Durchlässigkeit wurde merkwürdigerweise *auch im Kernholz ein Absinken der Durchlässigkeit während des Versuchs und ein Wiederanstieg beim Umkehrversuch* beobachtet. Bei den verwendeten Drucken von 10—50 atm/m sinkt die von Anfang an sehr geringe Durchlässigkeit mit der Zeit allerdings weit weniger schnell und nicht so tief ab wie bei den entsprechenden Splintholzproben (Abb. 1); andererseits erfolgt auch nach dem Umkehrversuch nur ein langsamerer und nicht so hoher Anstieg der Durchlässigkeit.

All das kann vielleicht auf folgende Weise erklärt werden: Im Kernholz sind, bis auf ganz wenige Ausnahmen, alle Tüpfel verschlossen und außerdem mehr oder weniger gut verklebt. Es ist aber immerhin denkbar, daß einige entweder noch frei sind oder unter den angewendeten hohen Drucken frei werden und im Filtrations- und Umkehrversuch reagieren können.

Für die Praxis der Holzimprägnierung ist in vielen Fällen das sichere Erkennen der *Splint-Kern-Grenze* von Bedeutung. Meist handelt es sich darum, festzustellen, ob die angewendeten Imprägniermittel auch wirklich bis an die Grenze des Kernholzes eingebracht wurden. Diese Kerngrenze ist bei Kiefer und Lärche schon durch die Farbe leicht zu erkennen und kann hier außerdem noch durch Reagenzien deutlicher dargestellt werden (KOCH u. KRIEG 1938). Dagegen stehen gerade bei den „Reifholzbäumen" Fichte und Tanne, wo die Erkennung dieser

Grenze besondere Schwierigkeiten bereitet, bisher keine derartigen Reagenzien zur Verfügung (Liese J. u. W. 1954).

Auf Grund des geringeren Wassergehaltes im Kern (30—42%) gegenüber dem hohen Wassergehalt des Splintholzes (130—160%) wurde folgender *Schnellnachweis der Splint-Kern-Grenze* bei Fichte und Tanne entwickelt: In Trichloräthylen oder Tetrachlorkohlenstoff wird soviel zerkleinertes Paraffin gegeben, daß es sich gerade noch auflöst. Außerdem wird als Lösung II eine gesättigte Lösung von *Kobalt-II-chlorid* in Isopropylalkohol hergestellt, so, daß noch ein Bodensatz übrigbleibt. Etwa 0,5—2 ml dieser Lösung II werden unter Umschütteln zu etwa 10 ml der Paraffin-Lösung gemischt. Diese fertige blaue Reagenzlösung wird auf eine Stammscheibe des zu untersuchenden Baumes oder Mastabschnittes mit einem Pinsel aufgetragen oder vorsichtig daraufgegossen. In kurzer Zeit ($^1/_2$—3 Minuten) erscheint dann die *Splintholzzone farblos*, währenddem die Paraffinschicht auf dem *Kernholz zunächst blau* gefärbt bleibt. Erst nach längerer Zeit erfolgt auch hier der allmähliche Farbumschlag, wahrscheinlich unter gleichzeitiger Einwirkung der Luftfeuchtigkeit. Diese abgewandelte *Kobaltmethode* (Stahl 1894) beruht auf dem bekannten Farbumschlag des trocken blauen Kobaltchlorürs bei Befeuchtung, die im wasserreichen Splint schneller erfolgt als im relativ trockenen Kernholzbereich.

2. Unterschiede zwischen Früh- und Spätholz

Nach Phillips (1933) unterscheiden sich Früh- und Spätholz neben vielem anderen auch in Form und Schließhautmechanismus der Hoftüpfel: Die im Frühholz reichlich vorhandenen Tüpfel, mit zarten Tori, sind durchlässiger, werden jedoch bei der Austrocknung leichter verschlossen als die spärlicheren, aber gröberen Tüpfel des Spätholzes; bei künstlicher Trocknung wie natürlicher Verkernung schließen sich 90—100% der Frühholz-, dagegen nur 40—60% der Spätholztüpfel.

Es lockte, die Auswirkung solcher anatomischer Befunde im Filtrationsversuch zu prüfen. Die Möglichkeit, die Durchlässigkeit von Früh- und Spätholz getrennt zu bestimmen, boten so weitringig erwachsene Hölzer wie *Sequoia gigantea* und *Larix leptolepis* (vergleiche die getrennten Wichtebestimmungen für Früh- und Spätholz durch Vintilå 1939). Aus dem Splint- und Kernholz solcher Bäume wurden quadratische Prismen entnommen, welche nur Frühholz oder nur Spätholz enthielten. Mit viel Geschick und Verständnis hat daraus der Münchner Drechslermeister B. Steinberger Holzzylinder hergestellt, welche bei einem Durchmesser von nur 2—3 mm und einer Länge von 10—20 mm entweder nur aus Frühholz oder nur aus Spätholz bestanden. Nach der im Teil I, Seite 647, beschriebenen Methode wurden auch diese Proben mit Wasser gesättigt. Anschließend wurde die Durchlässigkeit für Wasser geprüft. Die im Teil I, Seite 648f., beschriebene Versuchsanordnung wurde dazu insoweit abgeändert, daß ein Schlauchsystem hergestellt wurde, welches durch Zwischenschalten von immer enger werdenden Glasrohrstückchen von einem Schlauchdurchmesser von 15 mm auf einen Durchmesser von nur 1—2 mm reduziert wurde. In dieses letzte enge Schlauchstück wurden die kleinen Holzzylinder eingesetzt, während

die Flüssigkeit unter geringem Druck daraus hervorströmte. Nur so konnte die gleichmäßige und luftblasenfreie Füllung dieses ganzen Schlauchsystems erreicht werden.

Diese Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen, doch scheinen die bereits vorliegenden Ergebnisse der Mitteilung wert: *Das Frühholz ist im Anfang 100mal wegsamer als das Spätholz; infolge Tüpfelverschluß sinkt aber die Durchlässigkeit des Frühholzes rasch auf rund 1% des Anfangswertes und liegt damit nur noch wenig über der Durchlässigkeit des Spätholzes.* Das von Anfang an schwer durchlässige Spätholz zeigt eine viel geringere Abnahme der Durchlässigkeit mit der Zeit: auf etwa 60% des Anfangswertes im Laufe von 6 Tagen (Abb. 1).

Sogar *Umkehrversuche* konnten mit diesen kleinen Probezylindern schon ausgeführt werden: Dabei stieg die Durchlässigkeit der Frühholzprobe von rund 1% des Anfangswertes nach der Umkehrung auf rund 11% der ursprünglichen Durchlässigkeit (also auf etwa das 11fache), während die Durchlässigkeit der Spätholzprobe von rund 10% des Ausgangswertes nach der Umkehrung auf etwa 80% (also auf das 8fache) anstieg.

3. Polarität der Durchlässigkeit?

Die Tracheiden werden im Baum vorwiegend in einer Richtung durchströmt: der „aufsteigende" Saftstrom transportiert Wasser und Mineralstoffe von den Wurzeln zu den Blättern. „Rückläufige" Strömungen kommen aber z. B. bei nächtlichem Regen vor und werden auch durch Farbstoffversuche nahegelegt, obwohl bei Verabreichung durch seitliche Bohrlöcher absteigende Färbung auch durch Störung der natürlichen Saugkraftverteilung erklärt werden kann.

Jedenfalls lag es nahe zu fragen, ob die anatomische Ausbildung der Leitungsbahnen auf die vorherrschende Durchströmung der Tracheiden ausgerichtet ist, oder ob Flüssigkeiten im Holz ebensogut in umgekehrter Richtung strömen können, ohne dabei größere Widerstände überwinden zu müssen. Diese Frage hatte schon Pappenheim (1889) und Strasburger (1891) beschäftigt, ohne daß sie zu eindeutigen Antworten kommen konnten. Sie konnten nur angeben, daß mit den damals zur Verfügung stehenden Mitteln keine Durchlässigkeitsunterschiede in den beiden entgegengesetzten Richtungen festzustellen waren. In neuerer Zeit kam W. Liese (1951b) bei Versuchen mit Teeröl zu dem gleichen Schluß, daß die axiale Orientierung des Holzes auf die Durchlässigkeit keinen Einfluß habe.

Inzwischen aber hat Bannan (1956) über eine Polarität der fusiformen Initialen berichtet, bei denen er ein um 30% bevorzugtes Längenwachstum nach der Basis hin feststellen konnte. Außerdem wurde bei den eigenen Versuchen zum Teil beobachtet, daß bei mehrmalig wiederholten Umkehrversuchen die Spitzendurchlässigkeiten in beiden Richtungen ungleich schnell abklangen. Daraufhin wurde planmäßig auf allfällige polare Durchlässigkeitsunterschiede geachtet. Es ergaben sich aber weder bei aufeinanderfolgenden Versuchen mit demselben Klötzchen (Sukzedanversuche im Sinne Montforts, 1932) noch bei Parallelversuchen mit quer durchschnittenen, sorgfältig halbierten Proben, welche nebeneinander normal oder invers durchströmt wurden (Simultan-Versuche), systematische Unterschiede. Etwaige polare Durchlässigkeitsunterschiede müßten also unter der Grenze der jetzigen Meßgenauigkeit (5—10%) liegen.

4. Verhalten von Laubhölzern

Angesichts der unerwartet reichhaltigen Problematik, welche die Untersuchung der axialen Durchlässigkeit der Nadelhölzer bot, wurde die Durchlässigkeit von Laubhölzern nur in orientierenden Versuchen geprüft. Die folgende Tabelle soll eine Vorstellung geben von der Größenordnung der bei verschiedenen Holzarten unter gleichem Druck (1 atm/m) gemessenen Filtrationsgeschwindigkeiten:

	cm/h
Aristolochia macrophylla	*4000—4500*
Clematis vitalba	*3000—3500*
Robinia pseudacacia	*200—400*
Fagus silvatica	*80—100*
Sambucus nigra	*30—35*
Pinus strobus	*20—30*
Larix decidua	*15—30*
Thuja spec.	*10—15*
Abies alba	*5—10*

Im Gegensatz zu dieser guten axialen Durchlässigkeit der Laubhölzer steht deren schlechte Durchlässigkeit in radialer und tangentialer Richtung, welche nach den Ergebnissen von Hartmann-Dick (1954) z. B. für Ahornholz *(Acer pseudoplatanus)* nur rund 10% der durchschnittlichen tangentialen und radialen Durchlässigkeit gleichdicker Nadelholzproben beträgt. Die Umrechnung von Angaben aus der Arbeit von Hartmann-Dick ergab folgende Vergleichswerte für tangentiale und radiale Filtrationsgeschwindigkeiten (bei Anwendung eines durchschnittlichen Druckes von 500 atm/m):

	cm/h
Pinus silvestris	*2—4*
Picea excelsa	*1—7*
Acer pseudoplatanus	*0,2—0,5*

Wenn es sich in diesen beiden Tabellen auch nicht um dieselben Holzarten und Drucke handelt, sondern nur um einzelne Vertreter der Laub- und Nadelhölzer, so dürfen aus diesen Angaben doch wohl die folgenden allgemeinen Schlüsse bezüglich der größenordnungsmäßigen Durchlässigkeitsunterschiede gezogen werden:
Bei Nadelhölzern beträgt das Verhältnis der radialen und tangentialen Durchlässigkeit zur axialen etwa 1:1000—1:5000, bei zerstreutporigen Laubhölzern (Buche, Ahorn) hingegen etwa 1:100000.

Gerade in letzter Zeit wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen entscheidende Unterschiede zwischen dem Bau der Hoftüpfel der Nadelhölzer und dem der intervasculären Hoftüpfel der Laubhölzer festgestellt: Die Tüpfel der Laubhölzer haben keine Tori, und die Schließhaut ist eine echte Membran mit Primärwandtextur (Frey-Wyssling, Mühlethaler u. Wyckoff 1948; Eicke 1957;

Liese W. 1957). Es ist jedoch kaum anzunehmen, daß diese Unterschiede im Hoftüpfelbau für die sehr niedrige radiale und tangentiale Wegsamkeit der Laubhölzer verantwortlich zu machen sind; vielmehr wird wohl der hohe Anteil von Fasern und Parenchym beim Aufbau der Laubhölzer (Huber u. Prütz 1938) und die dadurch bedingte isolierte Stellung der einzelnen Gefäße der Grund für die sehr niedrige Querwegsamkeit der Laubhölzer sein.

Im allgemeinen war auch bei den Laubholzproben im Laufe der ersten Stunden eine Änderung (teilweise Zunahme, meist Abnahme) der Durchlässigkeit festzustellen, wie dies auch aus den Ergebnissen von I. Schmidt (1954) hervorging. Doch war im Umkehrversuch kein Anstieg der Durchlässigkeit zu beobachten. Daraus kann wohl geschlossen werden, daß die Durchlässigkeitsänderungen bei Laubholzproben durch Adsorptions- und Quellungsvorgänge hervorgerufen werden, nicht aber durch Auftreten von Tüpfelverschlüssen.

5. Chemische Beeinflußbarkeit der Wasserleitfähigkeit und des Hoftüpfelverschlusses

Über den Einfluß von Ionen sowie organischen Stoffen und Lösungsmitteln auf die Durchlässigkeit des Holzes liegen schon verschiedene Untersuchungen vor (Johnston u. Maass 1930, Liese W. 1951a, Sandermann, Schärfe u. Froede 1951, Schmidt I. 1954, Hartmann-Dick 1955). Die Ergebnisse eigener Untersuchungen über die Durchlässigkeit für gelöste Stoffe und über deren Adsorption im Holz sollen, wie eingangs gesagt, erst in einer späteren Arbeit dargestellt werden. Hier sollen, des Zusammenhanges wegen, nur jene Versuche bereits jetzt vorläufig mitgeteilt werden, in welchen auf chemischem Wege der Hoftüpfelverschluß beeinflußt werden konnte.

a) Alkohol. Die Anwendung von Alkohol ist wohl eine der ältesten Methoden, im Experiment die Durchlässigkeit des Holzes zu beeinflussen (Strasburger 1891, Griffin 1919, W. Liese 1951a, Sandermann u. Jonas 1952, Hartmann-Dick 1954). Im Anschluß an die Durchtränkung von Holzproben mit Alkohol nach verschiedenen Methoden konnte von allen Autoren übereinstimmend eine bessere Durchlässigkeit des Holzes für wäßrige und für ölige Holzschutzmittel erzielt werden.

Auch bei den eigenen Versuchen mit 94%igem Äthylalkohol, der mit Methylalkohol oder teilweise mit Benzol vergällt war, konnten diese Befunde bestätigt werden. Besonders bei Kernholz-, aber auch bei Splintholzproben zeigte sich schon im Laufe der ersten Stunden und, bis zu mehreren Tagen anhaltend, eine *Erhöhung der Durchlässigkeit* des Holzes für Alkohol, teilweise bis auf das Doppelte des Anfangswertes, worauf dann ein allmähliches Absinken der Durchlässigkeit bis auf 50% des Anfangswertes und darunter folgte (Abb. 2).

Bei *Umkehrversuchen* wurde auch hier ein „Umkehreffekt" beobachtet, der hier allerdings unregelmäßiger war als bei den Versuchen mit Wasser. Die Durchlässigkeit stieg dabei teilweise auf das 2—5fache des Endwertes vor der Umkehr an, was häufig 100—150% des Wertes zu Beginn der Versuche ausmachte. Das Maximum des Anstieges und der Übergang zu einem erneuten Absinken der Durchlässigkeit wurden hier, im Gegensatz zu den Versuchen mit reinem Wasser, erst nach 5—24 Stunden beobachtet.

Insgesamt scheint es sich bei den Einwirkungen des Alkohols auf das Holz wohl um drei verschiedene Vorgänge zu handeln:

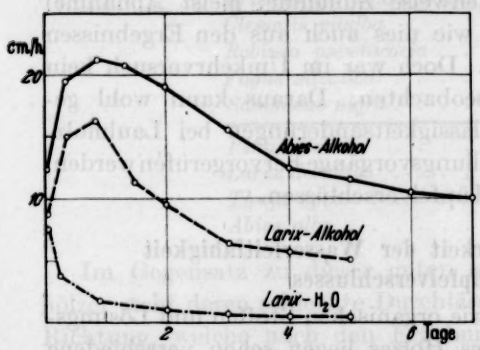


Abb. 2. Vergleich der absoluten Durchlässigkeit von Tannen- und Lärchensplintholz für Wasser und Alkohol: Erhöhung der Durchlässigkeit durch Alkohol

1. werden dabei wahrscheinlich Kittsubstanzen der bereits verklebten Hoftüpfel gelöst, ein Vorgang, der besonders bei den Kernholzproben eintritt.

2. wird es sich wohl, und zwar besonders bei den Splintholzproben, um eine Beeinflussung der Durchlässigkeit durch einen direkten chemischen Eingriff in den mikrochemischen Aufbau der Hoftüpfel-Schließhäute handeln. Es wurde festgestellt, daß gerade hier, ebenso wie in den Mittellamellen der Zellwände, Lignin, amorphe Holzpolyosen (Pentosane, Hexosane) und Pektinstoffe gehäuft auftreten (BAILEY 1936, HÄGGLUND 1951, SANDERMANN 1956, FREY-WYSSLING, BOSSHARD u. MÜHLETHALER 1956). Das äußerte sich auch in dem besonderen färberischen Verhalten der Hoftüpfel-Schließhäute (HUBER u. MERZ 1958). Durch Alkohol können aber gerade Pentosane und Pektine in ihren kolloidchemischen Eigenschaften weitgehend verändert werden (SANDERMANN u. JONAS 1952).

3. wird wohl wegen der sehr niedrigen Oberflächenspannung des Alkohols (22 dyn/cm, im Gegensatz zu Wasser mit 73 dyn/cm) das Ansaugen der Tori an die Tüpfelhöfe verhindert. Dieser Einfluß des Alkohols ist zu beobachten, wenn frisches Splintholz mit Alkohol durchtränkt und erst anschließend der Trocknung unterworfen wird.

b) Sublimat. Besonders auffällig und bisher wohl nicht beschrieben ist der Einfluß von Sublimat-Lösungen auf die Durchlässigkeit von Nadelhölzern. Es wurden Konzentrationen von 10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5} durch verschiedene Nadelholzproben geschickt. Während bei den Durchlässigkeitsversuchen mit Wasser, je nach den angewendeten Drucken, schon nach wenigen Minuten oder spätestens nach ein bis zwei Stunden ein mehr oder weniger starker Abfall der Durchlässigkeit des Holzes als Folge des Hoftüpfelverschlusses eintritt, *verhindert Sublimat*

in ausreichender Konzentration die Bewegung der Hoftüpfelschließhäute offenbar vollständig. Wie bereits in der „Kurzen Originalmitteilung" von HUBER u. MERZ (1956) mitgeteilt, wurde nämlich *bei Anwendung der Sublimat-Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4} kein merklicher Abfall der Durchlässigkeit* beobachtet. Dieser betrug selbst nach Tagen und Wochen höchstens einige Prozent gegenüber dem Anfangswert. Sublimat in der Verdünnung von 1:100000 dagegen nahm eine Mittelstellung zwischen reinem Wasser und den konzentrierteren Sublimat-Lösungen ein, d. h. ein Abfall der Durchlässigkeit um 10—50% im Laufe von Tagen bis Wochen wurde beobachtet (Abb. 3).

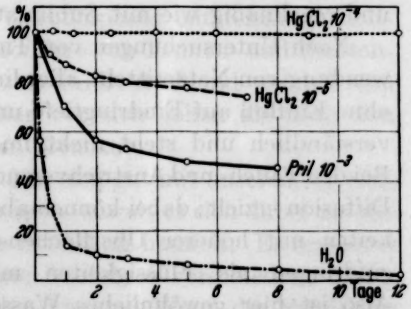


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der relativen Durchlässigkeit von Lärchensplintholz für Wasser-, Sublimat- und „Pril"-Lösungen: Verhinderung des Abfalls der Durchlässigkeit unter dem Einfluß der Chemikalien

Bei den durchgeführten Umkehrversuchen war ebenfalls, wie zu erwarten, keine Änderung der Durchlässigkeit zu beobachten, soweit es sich um die Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4} handelte.

Durch die Sublimat-Lösungen werden offenbar bestimmte Stoffe, wohl vor allem in den Haltefäden der Tori, fixiert, und dadurch wird der Torus straffer gespannt und in seiner Mittelstellung unbeweglich gemacht. Es handelt sich dabei vermutlich um chemische und kolloidchemische Reaktionen vor allem des Lignins, das in den Hoftüpfel-Schließhäuten, ebenso wie in den Mittellamellen, offenbar besonders reichlich vorhanden sein muß (BAILEY 1936, SANDERMANN u. JONAS 1952, FREY-WYSSLING, BOSSHARD u. MÜHLETHALER 1956). Nach den Untersuchungen von SANDERMANN, FROEDE u. CASTEN (1951) wird aber wahrscheinlich das Sublimat im Holz gerade unter Auflösung der Äthylen-Doppelbindungen an die Seitenketten des Lignins bevorzugt angelagert.

c) Grenzflächenaktive Substanzen. Auch Wasser mit herabgesetzter Oberflächenspannung, sog. „entspanntes Wasser", wurde für diese Versuche herangezogen. Es wurden dazu Lösungen von „Pril"-Pulver in den Konzentrationen 10^{-3} und 10^{-4} verwendet. Dieses im Haushalt heute vielfach verwendete Spülmittel enthält als wirksame Substanzen sog. „grenzflächenaktive Verbindungen", und zwar eine Kombination von primären Alkylsulfaten und Alkylbenzolsulfonaten (KLING 1953). Durch diese Stoffe wird die Oberflächenspannung des Wassers, die normalerweise rund 70 dyn/cm beträgt, bei einer Konzentration von 10^{-4} auf ungefähr 50 dyn/cm herabgesetzt und bei einer Konzentration von 10^{-3} sogar auf weniger als 30 dyn/cm (KLING 1955). Dieser Wert

liegt in der Größenordnung der Oberflächenspannung von Alkohol und Aceton und ist auf alle Fälle niedriger als der von LIESE (1953) berechnete Wert für die kritische Grenz-Oberflächenspannung (32—35 dyn/cm), unterhalb welcher die Tori der Hoftüpfel wegen der zu geringen Oberflächenspannung solcher Flüssigkeiten nicht mehr angesaugt werden können.

Die Befunde dieser Untersuchungen ähneln den mit sehr verdünnten Sublimat-Lösungen erhaltenen Ergebnissen: Mit Lösungen von „Pril" in der Konzentration von 10^{-3} konnte bei Nadelholz der *Abfall der Durchlässigkeit weitgehend verhindert* werden, wenn auch nicht so eindeutig und regelmäßig wie mit Sublimat (Abb. 3).

Nach Untersuchungen von THEDEN u. SCHULZE (1943) war die Verwendung von Netzmitteln, allerdings bei Tauch- und Anstrichversuchen, ohne Einfluß auf Eindringtiefe und -geschwindigkeit. Das ist durchaus verständlich und steht nicht im Widerspruch zu unseren Befunden. Bei den Tauch- und Anstrichversuchen wird die Eindringung ja nur durch Diffusion erzielt; dabei können aber in die Capillaren des Holzes Flüssigkeiten mit höherer Oberflächenspannung sogar weiter und schneller eindringen als Flüssigkeiten mit niedrigerer Oberflächenspannung. Also ist hier gewöhnliches Wasser gegenüber „entspanntem" Wasser sogar im Vorteil, wenn man von dem Vorzug der Verbesserung der Benetzbarkeit rauher oder verschmutzter Oberflächen durch „entspanntes" Wasser absieht.

6. Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis

Mehrere der im Rahmen dieser Laborversuche gefundenen Ergebnisse, über die hier und im Teil I berichtet wurde, dürften auch für die Praxis des Holzschutzes sofort von Bedeutung sein oder sich doch nach einigen weiteren, größer angelegten Versuchen gut verwerten lassen.

Als erstes soll hier auf die Bedeutung der aus den Umkehrversuchen gewonnenen Erkenntnisse über die *reversiblen Hoftüpfelverschlüsse*, über die wir im Teil I ausführlich berichteten, hingewiesen werden (HUBER u. MERZ 1958). Diese Tatsachen könnten einerseits zu einer Abkürzung der langen Tränkzeiten führen, wie sie besonders beim Original-Boucherie-Verfahren, aber auch noch bei den verbesserten axialen Tränkverfahren in Kauf genommen werden müssen (MAHLKE, TROSCHEL u. J. LIESE 1950, GEWECKE 1957). Andererseits könnte dies vielleicht der Weg sein, um die bisher nur schwer imprägnierbaren Fichten- und Tannenmaste überhaupt einer gleichmäßigen Durchtränkung zugänglich zu machen.

Unabhängig von unseren Versuchen wurden auf diesem Gebiet, offenbar schon seit mehreren Jahren, von HENRIKSSON (1954) bei der Bolidens Gruvaktiebolag in Schweden Versuche durchgeführt, um ein verbessertes Verfahren für die Tränkung von Masten zu entwickeln.

Dabei sollen die Störungen eines eventuellen Tüpfelverschlusses dadurch umgangen oder schon verschlossene Tüpfel vielleicht dadurch wieder geöffnet werden, daß die Druckphase jeweils nur kurze Zeit (2—5 Minuten) andauert, und daß dann auf das Holz während einer noch kürzeren Zeitdauer (1—3 Minuten) ein Vakuum einwirkt. Dadurch wird zwar aus den Masten wieder ein Teil der eingebrachten Tränkflüssigkeit herausgesaugt, doch wird dadurch gleichzeitig einer Verlagerung der Tori in den Hoftüpfeln entgegengewirkt und beginnender Hoftüpfelverschluß wieder rückgängig gemacht. Anschließend folgt eine neuerliche Druckphase und wieder eine Vakuumphase und so fort: „*Wechseldruckmethode*"! Trotz des durch die Vakuumphase entstehenden Zeitverlustes soll die Imprägnierung, insbesondere von Tannen- und Fichtenmasten, nach diesem neuen, seit kurzem in Deutschland patentierten Verfahren (Henriksson 1957) schneller vor sich gehen als nach den Verfahren mit Anwendung konstanten Druckes.

Diese Messungen aus der Praxis decken sich gut mit unseren eigenen, an Probezylindern gewonnenen Ergebnissen, soweit es sich dabei um die reversiblen Verlagerungen der Tori im Splintholz handelt. Es erscheint daher durchaus möglich, daß dieses neue Verfahren verschiedene bisher vorhandene Schwierigkeiten überwinden könnte. Wenn die Erfolge in der Praxis den Ergebnissen bei der Entwicklung des Verfahrens entsprechen, so dürfte es wegen der Zeitersparnis und der besser gesicherten und gleichmäßigeren Imprägnierung von bisher schwer imprägnierbaren Hölzern lohnend sein, bestehende Anlagen, trotz des Kostenaufwandes, auf das neue Verfahren umzustellen.

Zweitens sei hier auf die praktische Bedeutung der Möglichkeiten zur *Verhinderung des Tüpfelverschlusses durch chemische Einflüsse* hingewiesen. Die längst bekannten Wirkungen des Alkohols auf das Holz konnten wegen der Unwirtschaftlichkeit keinen Eingang in die Praxis finden. Wenn man aber mit Netzmitteln oder noch besser mit sehr verdünnten Sublimat-Lösungen das Schließen der Tüpfel verhindern kann, so sollte dieses Verfahren sehr bald praktisch anwendbar sein: *Sublimat-Vorfixierung*. Es müßte dazu eine doppelte Tränkung ausgeführt werden: Beim ersten Tränkvorgang würde das Holz in saftfrischem Zustande, also entweder am stehenden Baum (Plankl 1955) oder spätestens ein bis zwei Wochen nach der Fällung, mit einer Netzmittel-Lösung oder mit sehr verdünnten Sublimat-Lösungen nach einem der axialen Tränkverfahren getränkt werden. Entweder unmittelbar anschließend oder nach einer entsprechenden Lagerzeit könnte dann die Einbringung der nötigen Mengen von U- oder UA-Salzen erfolgen, welche wesentlich billiger sind als das Sublimat. Durch den ersten Tränkvorgang soll dabei der bei der Trocknung normalerweise eintretende Hoftüpfelverschluß verhindert werden, was besonders bei Fichten- und

Tannenholz eine gleichmäßigere Durchtränkung ermöglichen sollte. Andererseits könnten durch das Sublimat die Hoftüpfelschließhäute sogar derart fixiert werden, daß sie auch bei einem anschließenden axialen Tränkvorgang mit U- oder UA-Salzen nicht durch den axialen Druck verschlossen werden können; dadurch sollte eine Verkürzung der Tränkzeiten zu erreichen sein. Inwieweit auf diesem geschilderten Wege Fichten- und Tannenholz sogar einer befriedigenden Tränkung mit Teeröl zugänglich gemacht werden könnten, kann hier noch nicht abgeschätzt werden. Die genannten Vorteile sollten aber auf alle Fälle die mit dem Vorschlag verbundenen Nachteile des doppelten Tränkvorganges und die Ausgaben für das Fixationsmittel (Sublimat, Netzmittel usw.) völlig aufwiegen, weil durch dieses Verfahren gewisse Tränkungen vielleicht überhaupt erst möglich gemacht werden.

Schließlich sei noch auf die auf S. 661f. beschriebene *Kobaltmethode zur Erkennung der Splint-Kern-Grenze bei Fichten- und Tannenholz* hingewiesen. Eine einfache Reagenzlösung, welche in der Hauptsache blaues, wasserfreies Kobalt-II-chlorid in gleichmäßiger Verteilung in Paraffin enthält, wird dabei auf die zu untersuchenden Stammscheiben gebracht, wobei das stark wasserhaltige Splintholz die blaue Reagenzmasse schnell entfärbt. Dadurch tritt der Bereich des Kernholzes deutlich blau gefärbt gegenüber dem farblosen Splintholz hervor.

Zusammenfassung

1. Die in der I. Mitteilung besprochenen Effekte (Rückgang der axialen Wasserleitfähigkeit infolge Hoftüpfelverschlusses und Umkehreffekt) sind im Frühholz mit seinen beweglicheren Schließhäuten stärker als im Spätholz; sie verschwinden selbst im Kernholz, trotz einer auf $^1/_{1000}$—$^1/_{10000}$ gesunkenen Leitfähigkeit, nicht ganz. Sie fehlen dagegen den geprüften Laubhölzern, deren Hoftüpfel auch keine Tori besitzen.

2. Behandlung der Proben mit Alkohol oder Netzmitteln erschwert das Spiel der Hoftüpfel; vor allem aber fixiert Sublimat bereits in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-4} die Tüpfelschließhäute und verhindert die beschriebenen Effekte. Daraus ergeben sich Vorschläge für eine verbesserte Tränktechnik (Wechseldruckverfahren, Sublimat-Vorfixierung).

Literatur.

Bailey, I. W.: Lignin in Douglas fir. I. Composition of the Middle Lamella. II. The Pentosan Content of the Middle Lamella. Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit. **8**, 52—55, 389—391 (1936). — Bannan, M. W.: Some aspects of the elongation of fusiform cambial cells in Thuja occidentalis L. Canad, J. Bot. **34**, 175—196 (1956). — Eicke, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gymnospermenhölzern als Beitrag zur Phylogenie der Gnetales. Bot. Jb. **77**, 193—217 (1957). — Erdtman, H.: Zur Kenntnis der Extraktivstoffe des Kiefernkernholzes. Naturwissenschaften **27**, 130—131 (1939a). — Die phenolischen Inhalts-

stoffe des Kiefernkernholzes, ihre physiologische Bedeutung und hemmende Einwirkung auf die normale Aufschließbarkeit des Kiefernkernholzes nach dem Sulfitverfahren. Justus Liebigs Ann. Chem. **539**, 116—127 (1939b). — Frey-Wyssling, A., K. Mühlethaler u. R. W. G. Wyckoff: Mikrofibrillenbau der pflanzlichen Zellwände. Experientia (Basel) **4**, 475—476 (1948). — Frey-Wyssling, A., H. H. Bosshard u. K. Mühlethaler: Die submikroskopische Entwicklung der Hoftüpfel. Planta (Berl.) **47**, 115—126 (1956). — Gewecke, H.: Die Frischimprägnierung von Masten aus Fichten- und Tannenholz nach dem Saftverdrängungsverfahren. Holz als Roh- und Werkstoff **15**, 119—124 (1957). — Griffin, G. J.: Bordered pits in Douglas fir. a study of the position of the torus in mountain and lowland specimens in relation to creosote penetration. J. Forestry **17**, 813—822 (1919). — Hägglund, E.: Chemistry of Wood. New York 1951. — Hartmann-Dick, U.: Untersuchungen über die Durchlässigkeit des Holzes bei der Druckfiltration. I. Durchlässigkeit für Wasser. Forstwiss. Cbl. **73**, 40—63 (1954). — II. Durchlässigkeit für Lösungen verschiedener Art. Forstwiss. Cbl. **74**, 163—183 (1955). — Henriksson, St. T.: Holztränkung nach der Wechseldruckmethode. Holz als Roh- u. Werkstoff **12**, 233—241 (1954). — Verfahren und Vorrichtung zum Imprägnieren von Holz. DBP Nr 967212 vom 10. Okt. 1957. — Huber, B., u. G. Prütz: Über den Anteil von Fasern, Gefäßen und Parenchym am Aufbau verschiedener Hölzer. Holz als Roh- u. Werkstoff **1**, 377—381 (1938). — Huber, B., u. W. Merz: Über die Wirkung des Hoftüpfelverschlusses auf die Wasserleitfähigkeit von Nadelhölzern. Naturwissenschaften **43**, 114 (1956). — Über die Bedeutung des Hoftüpfelverschlusses für die axiale Wasserleitfähigkeit von Nadelhölzern. I. Grunderscheinungen. Planta (Berl.) **52** (1958). — Johnston, H. W., and O. Maass: Penetration studies. The path of liquid penetration in Jack pine. Canad. J. Res. **3**, 140—173 (1930). — Kling, W.: Wasserlösliche grenzflächenaktive Stoffe. Angew. Chem. **65**, 201—212 (1953). — Theorie des Waschens. Z. Elektrochem. **59**, 260—270 (1955). — Koch, J. E., u. W. Krieg: Neues Verfahren zur Unterscheidung von Kern und Splint im Kiefernholz. Chemiker-Ztg. **15**, 140—141 (1938). — Kollmann, F.: Über die physikalische und technologische Bedeutung der Kernstoffe des Holzes. IUFRO: Compt. Rend. 11. Congr. Rome 1953, 1045—1056, Firenze 1954. — Liese, J.: Holzschutz. Herausgeg. von W. Liese. Berlin 1954. — Liese, W.: Über die Eindringung von öligen Schutzmitteln in Fichtenholz. Holz als Roh- und Werkstoff **9**, 374—378 (1951a). — Über den Einfluß physikalischer Eigenschaften öliger Schutzmittel auf die Eindringung in Holz. Bitumen, Teere, Asphalte, Peche u. verw. Stoffe **2**, 276—279 (1951b). — Über die Hoftüpfel der Coniferen. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 203—211 (1953). — Der Feinbau der Hoftüpfel bei den Laubhölzern. Holz als Roh- u. Werkstoff **15**, 449—453 (1957). — Mahlke, F., E. Troschel u. J. Liese: Handbuch der Holzkonservierung, 3. Aufl. Berlin 1950. — Montfort, C.: Methodologie kausaler Fragestellungen und des physiologischen Experimentes in der vergleichenden Ökologie und experimentellen Pflanzengeographie. In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. XI, Teil 6, S. 267—334. 1932. — Pappenheim, K.: Zur Frage der Verschlußfähigkeit der Hoftüpfel im Splintholz. Ber. dtsch. bot. Ges. **7**, 2—19 (1889). — Phillips, E. W. J.: Movement of the pit membrane in coniferous woods, with special reference to preservative treatment. Forestry **7**, 109—120 (1933). — Plankl, L.: Der jahreszeitliche Verlauf der Transpiration als Grundlage der Lebendtränkung von Waldbäumen. Diss. München 1955. — Rennerfelt, E.: Undersönkingar över toxiciteten emot rötswampar hos tallkärnvedens fenoliska beståndsdelar (Untersuchungen über die Toxicität der phenolischen Inhaltsstoffe des Kiefernkernholzes gegenüber Fäulnispilzen). Medd. Stat. Skogsforskn. Anst. **33**, 331—364 (1944). — Sandermann, W.: Grundlagen der Chemie und Chemischen Technologie des Holzes. Leipzig 1956. —

Sandermann, W., O. Froede u. R. Casten: Über den Mechanismus der Sublimatfixierung an der Holzfaser. Holz als Roh- u. Werkstoff **9**, 456—460 (1951). — Sandermann, W., u. G.-Z. Jonas: Über die Imprägnierung von Hölzern mit öligen Schutzmitteln, unter besonderer Berücksichtigung der Fichte. Holz als Roh- u. Werkstoff **10**, 305—311 (1952). — Sandermann, W., E. Schärfe u. O. Froede: Über die Eindringtiefe des Sublimats bei einfacher und verbesserter Kyanisierung. Holz als Roh- u. Werkstoff **9**, 186—190 (1951). — Schmidt, I.: Über die Durchlässigkeit von Buchenstammholz für Wasser und Elektrolyte. Zulassungsarbeit München 1954. — Stahl, E.: Einige Versuche über Transpiration und Assimilation. Bot. Ztg. **52**, 117—146 (1/1894). — Strasburger, E.: Histologische Beiträge, Heft III: Über den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. Jena 1891. — Theden, G., u. B. Schulze: Untersuchungen über die Bedeutung von Netzmitteln für die Schutzbehandlung von Holz mit wäßrigen Lösungen. Holz als Roh- u. Werkstoff **6**, 241—245 (1943). — Trendelenburg, R.: Das Holz als Rohstoff, 2. Aufl., neubearbeitet von W. Mayer-Wegelin. München 1955. — Vintilă, Eu.: Untersuchungen über das Raumgewicht und Schwindmaß von Früh- und Spätholz bei Nadelhölzern. Holz als Roh- u. Werkstoff **2**, 345—357 (1939)

Prof. Dr. Bruno Huber und Dr. Walter Merz
Forstbotanisches Institut, München 13, Amalienstraße 52

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach Jansen" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Im April 1958 begann zu erscheinen:

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Herausgegeben von **W. Bargmann**, Kiel, und **J. Seiler**, Zürich

Abteilung

Histochemie

Herausgegeben von

M. Chèvremont, Liège — H. W. Deane, New York — P. B. Diezel, Heidelberg — F. Duspiva, Freiburg i. Br. — O. Eränkö, Helsinki — P. Gedigk, Bonn — W. Gössner, Tübingen — W. Graumann, Göttingen — A. G. E. Pearse, London — H. Reznik, Heidelberg — W. Sandritter, Frankfurt a. M. — T. H. Schiebler, Kiel — N. Schümmelfeder, Bonn — G. Siebert, Mainz — M. Wolman, Jerusalem

Die Zeitschrift erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften

„Histochemie" ist unabhängig von „Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie" käuflich"

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie

Herausgegeben von **W. Kikuth**, Düsseldorf, **K. F. Meyer**, San Francisco, **E. G. Nauck**, Hamburg, **A. M. Pappenheimer Jr.**, New York, **J. Tomcsik**, Basel

Im Januar 1958 erschien:

Einunddreißigster Band: Mit 43 Abbildungen. III, 256 Seiten Gr.-8°. 1958. DM 54.—

Inhaltsübersicht: **Allgemeine Morphologie menschen- und tierpathogener Virusarten.** Von W. Schäfer, Tübingen. — **Die enzymatische Anpassung bei Mikro-Organismen ohne Veränderung des Erbgutes.** Von M. Leiner, Mainz. — **Alte und neue Probleme der Staphylokokken.** Von L. Grün, Düsseldorf. — **Die Rückfallfieber.** Von H. Mooser, Zürich. — Namen- und Sachverzeichnis. — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis.

Im Juni 1957 erschien:

Dreißigster Band: Mit 63 Abbildungen. III, 343 Seiten Gr.-8°. 1957. DM 68.—

Inhaltsübersicht: **Multicellularity in Bacteria.** By K. A. Bisset, Birmingham/Great Britain. — **Bacterial Flagella and Motility.** By A. Pijper, Pretoria/South Africa. — **Die Anwendung von Phagen in der bakteriologischen Diagnostik mit besonderer Berücksichtigung der Typisierung von Typhus- und Paratyphus B-Bakterien sowie Staphylokokken.** Von H. Brandis, Frankfurt a. M./Deutschland. — **Das Kauffmann-White-Schema.** Von F. Kauffmann, Kopenhagen/Dänemark. — **Activités Bactériolytiques des Microorganismes.** Par M. Welsch, Liège/Belgique. — **Die Bakteriencytologie im Vergleich zum Feinbau höher differenzierter Zellen.** Von H. Ruska, Albany (New York)/USA. **Die serologische Diagnostik der Viruserkrankungen des Menschen.** Von W. Hennessen, Düsseldorf/Deutschland. — Namen- und Sachverzeichnis. — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG. Würzburg
Printed in Germany